

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**"SÍNTESIS DE NANO/MICROGELES CON NÚCLEO CATIONICO  
SENSIBLES AL MEDIO AMBIENTE PARA LA LIBERACIÓN DE  
MACROMOLÉCULAS"**

Tesis que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

Presenta:

**M. en C. Claudia Obeso Vera**

Director de tesis:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Co-Director de tesis:

Dr. Samuel Guillermo Meléndez López

# Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 108

Tijuana, B. C., a 25 de noviembre de 2013

C. Claudia Obeso Vera  
Pasante de: Doctor en Ciencias  
Presente


El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS

Es propuesto, por los CC. Dres. Samuel Guillermo Meléndez López y José  
Manuel Cornejo Bravo.

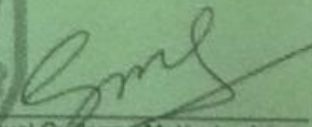
Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al  
tema "SÍNTESIS DE NANO/MICROGELES CON NÚCLEO CATIONICO SENSIBLES  
AL MEDIO AMBIENTE PARA LA LIBERACION DE MACROMOLÉCULAS".

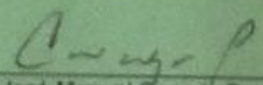
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

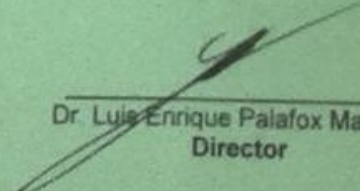
- I.- INTRODUCCION
- II.- TEORIA GENERAL
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSION
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS

  
Q. Noemi Hernández Hernández  
Sub-Director Secretario

FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA

  
Dr. Samuel Guillermo Meléndez López  
Co-Director de Tesis

  
Dr. José Manuel Cornejo Bravo  
Director de Tesis

  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
Director

## **DEDICATORIA**

Les dedico este trabajo a mis padres (Ismael Obeso & Francisca Vera †), quienes me han brindado grandes enseñanzas & amor, y me han acompañado a lo largo de este recorrido; también a mis hermanos (Luis Obeso & Mary Castelletta) quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional.

Take the first step in faith. You don't have to see the whole staircase. Just take the first step.

(by Martin Luther King, Jr.)

“Da tu primer paso ahora. No importa que no veas el camino completo. Solo da tu primer paso y el resto del camino ira apareciendo a medida que camines.”

(una de las versiones)

## AGRADECIMIENTOS

Estoy en profundo agradecimiento con el Dr. Manuel Cornejo quien tuvo la paciencia para aclararme dudas cada vez que necesitaba, y me aceptó en su grupo de laboratorio en donde tuve una estancia agradable, teniendo así la oportunidad de conocer compañeros de laboratorio muy buenos durante el transcurso del programa. Le agradezco al Dr. Samuel Meléndez quien aceptó ser mi asesor dentro del programa, y así abrió las puertas al posgrado de la UABC. En especial agradecimiento al Dr. David García, ya que sin su apoyo y motivación no hubiera resistido los 5 años que duro el trámite administrativo del título de la maestría.

A los siguientes les agradezco profundamente su apoyo que me dieron en el transcurso del programa con su apoyo: en especial al Dr. Ángel Líceca, por mantener las puertas abiertas del centro de graduados e invitarme a las juntas de polímeros las cuales me sirvieron bastante para seguir mejorando, también por permitirme hacer uso de los equipos y reactivos, a la Dra. Aracely Serrano por la introducción a la técnica de polimerización, consejos y sugerencias; a la Dra. Gaby Carrillo por su apoyo y asesorías, al Dr. Mario del Valle por su tiempo durante las evaluaciones, al Dr. Domingo Madrigal por sacar espectros de RAMAN; al Dr. Arturo Zizumbo por haberme permitido usar el IR; al M.C. Pedro Navarro por haber sacado las imágenes en el AFM, al Dr. Iván por haber entregado unos espectros de RMN- $H^+$ , al Dr. Marcos Ramos y Dra. Rosy Mares por la facilidad de usar su laboratorio y asesorías, a la QFB Gisela Andrea Camacho y al M.C. Mario Ramírez por asesorías de TLC, a la Dra. Amelia Olivas y Dr. Francisco Ruiz por la facilidad que brindaron para usar el TEM en CNYN UNAM Ensenada.

Le agradezco a cada compañero del posgrado de la UABC así como a los compañeros del Centro de Graduados del ITT, quienes me ayudaron a resolver problemas, dando sugerencias, ánimos, consejos, lecciones, etc. entre ellos puedo mencionar a: Vivi Sarmiento, Alejandra “la pato”, Zeila ‘la pitufa’, María

Castillo, Karla Suarez, Ramón Rodríguez, Yesenia, Carolina Flores, Hector Magaña, Kenia, Victor Gomez, Juani, Victor Iriarte, Brisia, Andrea, Paty, Felipe, Sandra Ponce, Mirian Gonzales, Tania Gonzalez. Agradezco el compañerismo de mis “roomates” Dalia de Orta, Angélica, Omar “Charly”, Dalia Castro “la gata” y Magali Lara.

Agradezco a las siguientes instituciones que fueron de gran importancia para llevar a cabo algunos análisis: ITT (centro de graduados), CNYN UNAM Ensenada, y UCSD (por tener acceso a los artículos). Especialmente agradezco a CONACYT por su apoyo financiero, finalmente agradezco a la UABC por todo el apoyo recibido.

Trabajo realizado en el Laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California con apoyo del proyecto SEP-CONACYT (CB 2010-1-157173).

## PUBLICACIONES Y CONGRESOS

A continuación se menciona la publicación y los trabajos presentados productos de este trabajo de investigación:

Artículo:

Claudia Obeso-Vera, José M. Cornejo-Bravo, Aracely Serrano-Medina, Ángel Líceca-Claveríe. *Effect of crosslinkers on size and temperature sensitivity of poly(N-isopropylacrylamide) microgels*. Polymer Bulletin **2013**, vol. 70 (2), pp 653-664.

Seminario:

Seminarios Interdisciplinarios 2013-1, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería).

Claudia Obeso Vera. "Nanogeles catiónicos para la liberación de fármacos y macromoléculas". Mayo 9 del **2013**. Tijuana, B.C.

Carteles:

XLV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, septiembre 23-26, **2012**, Oaxaca, Oaxaca.

Obeso V. Claudia, Cornejo B. José Manuel, Serrano M. Aracely, Líceca C. Ángel. "Efecto del entrecruzante en el tamaño de nano/microgeles de NIPAAm".

VIII Simposio Internacional: Investigación Química en la Frontera. Noviembre 16-18, **2011**, Tijuana, B.C.

Claudia Obeso-Vera, José M. Cornejo-Bravo, Aracely Serrano-Medina, Ángel Líceca-Claveríe. "Efecto del entrecruzante en el tamaño de microgeles de NIPAAm sintetizados por la técnica de polimerización por dispersión".

## INDICE

### CONTENIDO

### Página

Hoja de aprobación	II
Dedicatoria	III
Frase	IV
Agradecimientos	V
Publicaciones y congresos	VIII
Índice	IX
Índice de figuras	XV
Índice de tablas	XVIII
Lista de abreviaturas	XIX
Resumen	XXI
Abstract	XXIII

### Capítulo I. INTRODUCCION

1.1	Antecedentes	2
1.2	Justificación	3
1.3	Hipótesis	4
1.4	Objetivo general	5
1.5	Objetivos específicos	5

### Capítulo II. TEORIA GENERAL

2.1	Sistemas de liberación de fármacos	8
2.2	Ruta de administración de fármacos	9
	2.2.1 Vía oral	9
	2.2.2 Vía parenteral	9
	2.2.3 Vía transdermal	11
	2.2.4 Vía transmucosal	11

2.2.5	Vía nasal	12
2.2.6	Vía rectal	12
2.2.7	Vía pulmonar	13
2.2.8	Vía cardiovascular	13
2.2.9	Vía intra-médula ósea	13
2.3	Nanosistemas de liberación de fármacos	14
2.3.1	Liposomas	16
2.3.2	Micelas poliméricas	17
2.3.3	Dendrímeros	18
2.3.4	Nanopartículas	19
2.3.5	Nanoesferas	19
2.3.6	Nanosuspensiones	19
2.3.7	Nanofibras y nanotubos	20
2.3.8	Nanogeles/microgeles	20
2.4	Nanosistemas de liberación dirigidos	22
2.4.1	Agentes inmuno-dirigidos	22
2.4.2	Agentes glicolípidos modificados dirigidos	23
2.4.3	Agentes magnéticos-dirigidos	23
2.5	Descripción breve de los reactivos principales empleados en este trabajo	23
2.5.1	Iniciadores	23
2.5.2	Monómeros	25
2.5.3	Entrecruzantes	28
2.5.4	Bacitracina	29
2.5.5	Vitamina B12	30
2.6	Síntesis de nano/microgeles	30
2.6.1	Polimerización por dispersión	31
2.6.2	Polimerización por precipitación	32
2.6.3	Polimerización por mini-emulsión inversa	32

2.6.4	Polimerización por micro-emulsión inversa	32
2.6.5	Polimerización por emulsión libre de detergente	33
2.7	Fundamento de técnicas de análisis	35
2.7.1	Medición de tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica	35
2.7.2	Medición del potencial Zeta por el Nano Zetasizer	37
2.7.3	AFM	38
2.7.4	TEM	38
<b>Capítulo III. PARTE EXPERIMENTAL</b>		
3.1	Lista de reactivos y solventes	41
3.2	Instrumentos de medición	42
3.2.1	Espectrofotómetros UV-Vis	42
3.2.2	Liofilizador	42
3.2.3	Potenciómetro	42
3.2.4	Dispensor de Luz Dinámica. DLS	42
3.2.5	Fluorómetro	42
3.2.6	Microscopio de fuerza atómica. AFM	42
3.2.7	Microscopio electrónico de transmisión. TEM	42
3.2.8	Espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier. FTIR	42
3.3	Purificación de reactivos	43
3.3.1	Purificación de NIPAAm	43
3.3.2	Purificación de DMAEM y EGDMA	43
3.4	Procedimiento experimental	43
3.4.1	Purificación de nano/microgeles	44
3.4.2	Liofilización	44

3.4.3	Reconstitución	44
3.4.4	Determinación del tamaño por DLS	44
3.4.5	Determinación del potencial Z	45
3.4.6	Titulación ácido-base (método potenciométrico)	46
3.4.7	Preparación de la muestra para microscopía AFM	46
3.4.8	Preparación de la muestra para microscopía TEM	47
3.5	Influencia de la carga del iniciador en la síntesis de nano/microgeles en la reacción de polimerización por emulsión libre de detergente.	47
3.5.1	Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente. <u>(NIPAAm/PEGMA, entrecruzante, iniciador)</u>	47
3.6	Estudio del efecto del entrecruzante en el tamaño de partícula mediante la reacción de polimerización por dispersión.	49
3.6.1	Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por dispersión. (NIPAAm, entrecruzante, iniciador)	49
3.7	Estudio de la incorporación de DMAEM en los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA.	50
3.7.1	Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente. (NIPAAm/PEGMA(70:30 w/w); entrecruzante, iniciador, DMAEM)	50
3.7.2	Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente. (NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> (70:30 w/w); DVA, iniciador, MA)	51
3.7.3	Marcado de la bacitracina con el isotiocianato de fluoresceína (isómero I)	52
3.7.4	Cargado de los nanogeles con vitamina B12	53
3.7.5	Determinación del cargado de los nanogeles con vitamina B12	53

3.7.6	Estudio de liberación de los nanogeles cargados con vitamina B12	53
-------	--	----

## **Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1	Influencia de la carga del iniciador en la síntesis de nano/microgeles en la reacción de polimerización por emulsión libre de detergente.	56
4.2	Estudio del efecto del entrecruzante en el tamaño de partícula mediante la reacción de polimerización por dispersión.	60
4.2.1	Determinación del tamaño de las partículas a una temperatura fija de medición.	60
4.2.2	Determinación de velocidad de reacción por medición de la transmitancia (turbidez).	62
4.2.3	Determinación del tamaño de las partículas respecto al tiempo de polimerización.	64
4.2.4	Determinación de la conversión respecto al tiempo de polimerización.	66
4.2.5	Determinación del efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles de NIPAAm preparados con diferentes entrecruzantes.	67
4.2.6	Micrografías de los microgeles preparados con 5.0% de entrecruzante.	71
4.3	Estudio de la incorporación de DMAEM en los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA.	72
4.3.1	Influencia de la cantidad de entrecruzante y el peso molecular del PEGMA en el tamaño de los microgeles sintetizados con DMAEM.	72
4.3.2	Estabilidad al proceso de liofilizado	74
4.3.3	Determinación del efecto de la temperatura y pH en el tamaño de los microgeles preparados con diferentes cantidades de DMAEM.	75
4.3.4	Determinación del contenido del DMAEM en los microgeles por medio de titulación ácido-base.	81

4.3.5	Determinación del potencial Z de los nano/microgeles.	84
4.3.6	Micrografías de los nano/microgeles (TEM).	86
4.3.7	Análisis del espectro de FT-IR	87
4.4	Marcado de la bacitracina con FITC	88
4.5	Cargado de los nano/microgeles	89
4.5.1	Cargado de los nano/microgeles con BAC-FITC	89
4.5.2	Cargado de los nano/microgeles con vitamina B12	89
4.5.3	Liberación de los nano/microgeles cargados con vitamina B12.	90

## **Capítulo V. CONCLUSIONES**

5.1	Influencia de la carga del iniciador en la síntesis de nano/microgeles en la reacción de polimerización por emulsión libre de detergente.	97
5.2	Estudio del efecto del entrecruzante en el tamaño de partícula mediante la reacción de polimerización por dispersión.	97
5.3	Estudio de la incorporación de DMAEM en los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA.	98

## **Capítulo VI. REFERENCIAS**

6.1	Referencias	101
6.2	Cibercitas	105

<b>Capítulo VII. ANEXOS</b>	<b>107</b>
-----------------------------	------------

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura correspondiente a los iniciadores utilizados.	24
2	Mecanismo de formación interfacial de la partícula general por medio de todos los tipos de polimerización por emulsión.	35
3	Diagrama general de la síntesis de nano/microgeles por polimerización por dispersión y por emulsión libre de detergente.	48
4	Medición del % de transmitancia ( $\lambda=600$ nm) con respecto al tiempo de reacción NIPAAm/PEGMA, EGDMA 1.0% e iniciador al 2.0%.	57
5	Medición del % de transmitancia ( $\lambda=600$ nm) con respecto al tiempo de reacción NIPAAm/PEGMA, DVA 1.0% e iniciador al 2.0%.	58
6	Medición del % de transmitancia ( $\lambda=400$ nm) con respecto al tiempo de reacción NIPAAm/PEGMA, AIBA 2.0% y entrecruzante al 1.0%.	59
7	Distribución del tamaño de microgeles preparados con tres diferentes entrecruzantes (5.0% mol de entrecruzante y 4.0% mol de APS). <b>a</b> 25°C, <b>b</b> 50°C	61
8	Medición del % de transmitancia con respecto al tiempo de micropartículas de NIPAAm dispersas, preparadas con tres diferentes entrecruzantes. (5.0% mol de entrecruzante y 2.0% mol de APS)	62
9	Medición del % de transmitancia con respecto al tiempo, de micropartículas de NIPAAm dispersas, preparadas con tres diferentes entrecruzantes. (5.0% mol de entrecruzante y 4.0% mol de APS)	63
10	Tamaño del diámetro hidrodinámico por intensidad de las partículas al finalizar la reacción a diferentes tiempos.	66
11	Evolución de la conversión durante el proceso de polimerización por dispersión.	67

12	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles de NIPAAm preparados con diferentes entrecruzantes.	70
13	Imágenes de topografías de microgeles de NIPAAm por AFM. Izquierda entrecruzante DVA, centro entrecruzante EGDMA, derecha entrecruzante MBA.	71
14	Nanogeles sintetizados con NIPAAm/PEGMA <sub>1100</sub> , DVA 5.0 y/o 2.5%, AIBA y/o APS 2.0% y DMAEM 5.0%, reacciones con AIBA a 70°C	73
15	Nanogeles sintetizados con NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 5.0 y/o 2.5%, AIBA y/o APS 2.0% y DMAEM 5.0%. Todas las reacciones con PEGMA <sub>2080</sub> a 85°C	74
16	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras de pH diferente. Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 0%.	76
17	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente. Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 5.0%.	76
18	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente (A). Ampliación (B). Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 15.0%.	77
19	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente (A). Ampliación (B). Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 20.0%.	77
20	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente. Muestra (A) NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y MA 10.0%, muestra (B) en lugar de AIBA, APS 2.0%	79
21	Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente (A). Ampliación (B). Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y MA 20.0%	80

22	Potencial Z de nano/microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente, (NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM.	84
23	Potencial Z de nano/microgeles en soluciones amortiguadoras con diferente pH. (NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA y/o APS 2.0% y MA 10.0%).	85
24	Microscopia TEM de la muestra del microgel sintetizado a partir de nano/microgel NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 20.0%, usando la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente.	87
25	Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12 en un medio con pH de 7.4.	91
26	Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12, en medio a pH 5.0.	92
27	Distribución de tamaños por intensidad (DLS).	94
28	Distribuciones de tamaño de los microgeles en ciclos altos y bajos de temperatura en un periodo de 27 horas	95

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Características fisicoquímicas de los iniciadores que se emplearon en la síntesis de nano/microgeles.	25
2	Tiempo total de reacción de síntesis de nano/microgeles por medio de la polimerización por emulsión libre de detergente, con todas las combinaciones entre iniciadores y entrecruzantes.	56
3	Diámetros hidrodinámicos medidos por intensidad por DLS a 25°C, con su correspondiente valor de PDI, tomada en el tiempo final de reacción, las cuales son diferentes para cada muestra.	58
4	T <sub>c</sub> , D <sub>h</sub> por intensidad a 25 y 50°C, y la razón de hinchamiento (D <sub>h,25 °C</sub> /D <sub>h,50 °C</sub> ) de los diferentes microgeles sintetizados.	68
5	Dimensiones de las micropartículas con 5.0% mol de entrecruzante.	71
6	Tamaño de los nano/microgeles antes y después del proceso de liofilización. NIPAAm/PEGMA <sub>2080</sub> , DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM.	75
7	pH de las soluciones de los nano/microgeles antes de titular	81
8	Determinación del contenido del MA en los microgeles por medio de titulación ácido-base.	82
9	Determinación del contenido del DMAEM en los microgeles por medio de titulación ácido-base	83
10	Datos a partir de los estudios de liberación	93
11	Determinación del tamaño de los microgeles después del proceso de liberación	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	microscopía de fuerza atómica
AIBA	dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
APS	persulfato de amonio
BAC	bacitracina
BAC-FITC	bacitracina marcada con isotiocianato de fluoresceína
BSI	British standards institution
$D_h$	diámetro hidrodinámico
DLS	dispersión de luz dinámica
DMA	dimetilacetamida
DMAEM	metacrilato de <i>N,N</i> -dimetilaminoetilo
DVA	3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro [5.5] undecano
EGDMA	dimetacrilato de etilenglicol
E. K. C.	compañía del Eastman Kodak
FITC	isotiocianato de fluoresceína
$K_d$	velocidad de descomposición
KPS	persulfato de potasio
LCST	temperatura crítica baja de solución
MA	ácido metacrílico
MBA	<i>N,N'</i> -metilenebisacrilamida
mcg	microgramo
NIPAAm	<i>N</i> -isopropil acrilamida
PEG	polietilenglicol
PEGMA	poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (1,100g/mol)
PEGMA <sub>1100</sub>	poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (1,100g/mol)
PEGMA <sub>2080</sub>	poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (2,080g/mol)
$T_c$	temperatura crítica de transición de fase
$t_{1/2}$	tiempo de vida media ( $t_{1/2} = \ln 2 / K_d$ )
TEM	microscopía electrónica de transmisión

TLC	cromatografía en capa fina
UV-Vis	espectrofotometría de ultravioleta-visible
VA-086	propionamida de 2,2'-azobis(2-metil-N-(2-hidroxi)etil)
MWCO	molecular weight cut off (peso molecular límite)

## RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto que tiene la carga de los iniciadores persulfato de amonio (APS), persulfato de potasio (KPS), 2,2'-azobis(2-metil-*N*-(2-hidroxietil) propionamida (VA-086) y dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (AIBA) en la formación y estabilización de las partículas durante la síntesis de nano/microgeles por medio de la polimerización por emulsión libre de detergente. Se utilizaron los siguientes monómeros: *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) y poli (etilenglicol) metil éter metacrilato (PEGMA<sub>1100</sub>); el entrecruzamiento fue con 3 tipos de entrecruzantes. Con el iniciador no-iónico (VA-086), no fue posible la microemulsión de las partículas, generándose precipitados durante el proceso de polimerización, lo cual impidió la formación de nano/microgeles estables en la solución. Con APS se obtuvo una distribución de tamaños más uniforme, similar a la obtenida con DVA (PDI=0.211) y EGDMA (PDI=0.248); con MBA (PDI=0.574) se obtuvieron dos distribuciones.

Se estudió el efecto de los entrecruzantes: 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5] undecano (DVA), dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), y *N,N'*-metilenbisacrilamida (MBA), en el tamaño y en las propiedades de hinchamiento de nano/microgeles sintetizados vía polimerización por dispersión. Se obtuvieron nano/microgeles de menor tamaño con DVA (351 nm), con MBA (630 nm) las partículas obtenidas fueron de mayor tamaño, y con EGDMA (410 nm) los nano/microgeles obtenidos presentaron un tamaño intermedio en relación a los anteriores. Este efecto se asoció a la relación hidrofóbica/hidrofílica característica de los entrecruzantes.

En el estudio de la incorporación de la molécula básica metacrilato de *N,N*-dimetilaminoetilo (DMAEM) a nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub> y DVA, sintetizados por polimerización por emulsión libre de detergente. Se observó que el iniciador se va a la superficie de la partícula, mientras que parte del DMAEM al parecer también está en la superficie, en una solución amortiguadora de pH=3.0. Al ponerlas en una solución amortiguadora a pH=9.0, se tuvo un potencial Z negativo, por la presencia de MA producto de la hidrólisis del DMAEM. Las

partículas obtenidas mostraron un diámetro de alrededor de 100 nm determinado por DLS y TEM.

Se encontró que las muestras sintetizadas con NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM al 5.0, 15.0 y 20.0% sufrieron un 61.0, 34.3 y 36.8% de hidrólisis respectivamente.

Los nano/microgeles presentaron un porcentaje bajo de cargado de vitamina B12 (2.4%). Al comparar los estudios de liberación a pH=7.4, los nano/microgeles liberan ligeramente más lento a una temperatura de 37 que a 42°C, a 37°C liberan aproximadamente un 75% en forma gradual en un periodo de 25 h y a 42°C lo hace en 10 h. La respuesta de liberación es opuesta en un medio a pH=5, liberan más rápido a 37°C, aproximadamente un 75% en 5 h, y a 42°C lo hace en 45 h.

## ABSTRACT

In this work, we studied the effect that the charge of the initiators: ammonium persulfate (APS), potassium persulfate (KPS), 2,2'-azobis(2-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl) propionamide (VA-086) and 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AIBA), has in the formation and stabilization of particles during the synthesis of nano/microgels using a detergent-free emulsion polymerization method. The following monomers were used: *N*-isopropylacrylamida (NIPAAm), poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA<sub>1100</sub>), crosslinking was performed by three different crosslinkers. With the non-ionic initiator (VA-086) particle microemulsion wasn't possible, so precipitates were generated during the polymerization process, and no stable nano/microgel formation in solution was possible. With APS a uniform particle size distribution was obtained, similar results were obtained with DVA (PDI=0.211), and EGDMA (PDI=0.248). In contrast, polymerization with MBA (PDI=0.574) resulted in two different size distributions.

We studied the effect that the crosslinkers: 3,9-divinyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5] undecane (DVA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), and *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBA), have on the nano/microgel's size and swelling properties synthesized by a polymerization-by-dispersion method. Smaller size nano/microgels were obtained with DVA (351 nm), while bigger size particles were obtained with MBA (630 nm). EGDMA (410 nm) yielded intermediate size particles. This behavior was associated with the hydrophilic/hydrophobic characteristics of the crosslinkers.

We studied the incorporation of the basic molecule *N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEM) to nano/microgels formulated with NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub> and DVA, and synthesized by a detergent-free emulsion polymerization method. We observed that both the initiator and DMAEM localize to the particle surface in a buffer solution pH=3.0. When this particles are in a buffer solution pH=9.0, they had a negative Z potential, due to acid groups (MA) from DMAEM's hydrolysis.

The obtained particles had an average diameter of around 100 nm, as determined by DLS and TEM.

It was found that particles synthesized from NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% and DMAEM 5.0, 15.0 y 20.0% suffered a 61.0, 34.3 y 36.8% of hydrolysis respectively.

The nano/microgels had a low drug loading percentage of 2.4%, (vitamin B12). Comparing the drug delivery studies carried in a buffer solution pH=7.4 and pH=5.0; the nano/microgels released slightly slower at 37°C than at 42°C in a pH=7.4. At 37°C the particles released gradually, approximately a 75% during 25 h and at 42°C they did it in 10 h. To the contrary, at pH=5.0 they released faster at 37°C, approximately a 75% in 5 h, and at 42°C in 45 h.



### 1.1 Antecedentes

Existe una variedad de vías de administración de fármacos (entre las más usadas están las vías: oral, parenteral, intranasal, y transdermal). Todas las vías de administración presentan ventajas y desventajas, las cuales junto con otros aspectos a considerar como lo son: el órgano o tejido dañado al que se quiere llegar, y el historial clínico del paciente, (entre los más importantes) sirven para ayudar a seleccionar la vía de administración que permita tener una acción del fármaco más efectiva. Sin embargo, en la actualidad todavía se pierde fármaco en su recorrido hacia su sitio de acción deseado y en muchos casos no se ha logrado tener una entrega y liberación adecuada, lo cual puede generar una infinidad de efectos adversos.

Desde hace más de tres décadas, se han estudiado una serie de nanopartículas que pudieran funcionar como sistemas de liberación de fármacos (también conocidos como sistemas de transporte de fármacos o vehículos de liberación de fármacos), las cuales pueden ser cargadas con fármacos y/o biomacromoléculas (tales como proteínas recombinantes, péptidos bioactivos entre otras). Estos nuevos sistemas de liberación han surgido del interés de mejorar el transporte de fármacos para ser liberados en el sitio, en la cantidad y en el tiempo requerido.

Un buen sistema de liberación debe cumplir con ciertas características como son tener baja toxicidad, tener propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco, y ser de un tamaño nanométrico que le permita atravesar poros y membranas celulares, por lo anterior estos sistemas de liberación pueden incrementar la efectividad del fármaco.

Recientemente, en la literatura científica especializada se ha observado un incremento en el interés sobre estos sistemas desde que se publicó la primera revisión sobre su síntesis y aplicaciones [Vinogradov et al., 2002]; estos sistemas de liberación, por ejemplo, tienen el potencial de mejorar la biodisponibilidad oral y

encefálica de oligonucleótidos. En este trabajo de investigación se estudió un sistema de liberación constituido por nano/microgeles. Se propuso usar la técnica de polimerización por emulsión sin detergente [Motokawa *et al.*, 2004], para la obtención de nanopartículas a partir de los monómeros de poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (PEGMA), *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm), y metacrilato de *N,N*-dimetilaminoetilo (DMAEM). Se determinó cual entrecruzante, iniciador y peso molecular de PEGMA son los que dan mejores características a las nanopartículas. Como entrecruzantes se utilizaron el 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5] undecano (DVA), dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), y *N,N'*-metilenbisacrilamida (MBA), y como iniciadores el persulfato de amonio (APS), persulfato de potasio (KPS), 2,2'-azobis(2-metil-*N*-(2-hidroxietil) propionamida (VA-086) y dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (AIBA). Se empleó PEGMA de 1100 g/mol y PEGMA de 2080 g/mol.

Una vez optimizada la formulación de la nanopartículas se prosiguió con los estudios de cargado y liberación; para realizar estos estudios se utilizó bacitracina unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la vitamina B12 como compuestos modelos.

### 1.2 Justificación

La obtención de nano/microgeles mediante polimerización en emulsión o microemulsión ha sido ampliamente documentada. La gran desventaja de este método es el uso de altas concentraciones de tensoactivo el cual resulta difícil de eliminar. Por lo tanto es indispensable desarrollar metodologías de obtención de nano/microgeles que no requieran del uso de tensoactivos (“soap-free” o “soapless”, “sin detergente”).

Las proteínas recombinantes y los péptidos bioactivos son cada día más utilizadas en la terapéutica. Una de las desventajas de estos agentes activos son su pobre estabilidad y su corta vida media. Estas moléculas requieren el

desarrollo de sistemas de liberación que mejoren su biodisponibilidad. Los sistemas nanométricos que se han estudiado hasta el momento utilizan dos métodos para el cargado de proteínas y péptidos. En el primero el cargado se realiza *in situ*, esto es durante la producción de las nanopartículas. Esto tiene la desventaja de exponer a las proteínas a condiciones drásticas y a la presencia de sustancias reactivas lo que puede producir su desnaturalización o desactivación. En el otro método las nanopartículas, ya preparadas se equilibran con una solución de la proteína. Este procedimiento tiene la desventaja de una baja eficiencia de cargado.

La acumulación de nanopartículas cargadas con fármacos antineoplásicos (ej. micelas poliméricas) de manera pasiva en tumores ha sido demostrado en varios estudios. La liberación del fármaco desde el núcleo de las nanopartículas se puede lograr utilizando materiales sensibles a la temperatura y/o el pH. El material sensible a la temperatura más estudiado es la NIPAAm la cual tiene una temperatura de transición de 32°C, por debajo de la temperatura corporal, por lo cual es necesario ajustar la temperatura con grupos hidrofílicos o ionizables. Por otra parte el cargado de fármacos insolubles en agua en esas estructuras nanométricas se ve limitada por la pobre afinidad con los núcleos de las partículas estudiadas. La presencia de grupos iónicos en el núcleo de la partícula incrementa considerablemente la interacción con fármacos de carga opuesta, incrementándose la eficiencia de cargado. La liberación del fármaco se lleva a cabo ya sea por control de la temperatura, el pH o la concentración de sales.

### 1.3 Hipótesis

Los nano/microgeles formulados con NIPAAm/PEGMA-DMAEM son capaces de responder a cambios de pH y temperatura generados en su entorno, pudiendo utilizarse como compuestos modelos para la liberación controlada al fármaco bacitracina y a la vitamina B12.

### 1.4 Objetivo general

- Obtener nano/microgeles catiónicos que cumplan con las características de un intervalo de tamaño de 70-200 nm y que respondan a cambios en el pH y temperatura del medio ambiente. Y estudiar sus posibles aplicaciones en la liberación controlada del antibiótico bacitracina y la vitamina B12

### 1.5 Objetivos particulares

- Evaluar la influencia de la carga del iniciador en la formación de las partículas.
  - Obtener nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA con (APS, KPS, AIBA y VA-086) y con cada uno de los siguientes entrecruzantes (DVA, EGDMA y MBA) por la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente.
- Evaluar la influencia del entrecruzante en el tamaño de partícula.
  - Obtener nano/microgeles de NIPAAm con APS al 2.0% y 4.0%, cada uno con los siguientes entrecruzantes (DVA, EGDMA y MBA) por la técnica de polimerización por dispersión.
- Obtener y optimizar los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA y DMAEM mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente.
- Hacer el marcado de la bacitracina con FITC.
- Evaluar la estabilidad de las partículas en solución, tamaño, PDI, carga de la superficie vía DLS.

- Determinar el efecto de la temperatura y pH en el diámetro hidrodinámico de las partículas vía DLS.
- Caracterizar la morfología y tamaño de las partículas por microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Hacer estudios de cargado de los nanogeles con bacitracina marcada y con vitamina B12.
- Hacer estudios de liberación de los nanogeles con bacitracina marcada y con vitamina B12.



### 2.1 Sistemas de liberación de fármacos

Un sistema de liberación de fármacos se define como una formulación o un dispositivo que facilita la introducción de una sustancia terapéutica en el cuerpo mejorando su eficacia y seguridad al controlar la velocidad, tiempo y lugar de liberación del fármaco en el cuerpo [Jain 2008]. Este proceso incluye la administración de productos terapéuticos, la liberación del ingrediente activo por el producto, y el transporte subsecuente de los ingredientes activos a través de las membranas biológicas del sitio de acción. El sistema de liberación de fármacos es una interface entre el paciente y el fármaco. Puede ser una formulación de un fármaco para administrarse con propósitos terapéuticos o un dispositivo que libere el fármaco.

Hay varias tecnologías en los sistemas de liberación de fármacos que afectan la liberación y biodisponibilidad del fármaco, aquí se mencionan algunas:

- Liberación general no específica hacia todos los tejidos.
- Liberación dirigida hacia un órgano o sistema.
- Sistema de liberación controlada (liberación sistémica).
- Liberación programada.
  - Liberación inmediata
  - Liberación programada a un tiempo definido / liberación pulsativa.
  - Liberación retardada, sostenida o prolongada, acción prolongada.
- Liberación controlada en un sitio específico, seguido de una entrega a un órgano requerido.
- Liberación en respuesta a estímulos ambientales.
- Liberación de fármacos dirigidos mediante un receptor.
- Tipo de dispositivos de liberación de fármacos.

### **2.2 Rutas de administración de fármacos**

Los fármacos pueden ser introducidos al cuerpo humano por varias rutas anatómicas. Los fármacos se administran para tener un efecto sistémico o para digerirse a varios órganos o a los sitios específicamente dañados. La vía de administración se escoge dependiendo de la enfermedad, del efecto deseado, del producto disponible y del historial clínico del paciente. Existe una clasificación de varias rutas anatómicas para la liberación de fármacos. A continuación se da una breve descripción de cada una de ellas.

#### **2.2.1 Vía oral**

Es la ruta históricamente más usada para liberación de fármacos convencionales así como para los sistemas de liberación más novedosos. Su preferencia se debe a su facilidad de administración y su gran aceptación entre los pacientes.

Presenta varias limitantes lo que ha llevado al estudio de nuevos sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida.

Entre sus limitantes se pueden mencionar: a) los fármacos que se toman oralmente para efectos sistémicos presentan casi siempre una gran variabilidad en la velocidad de absorción y esto dificulta predecir su concentración plasmática b) muchos compuestos polares y macromoléculas no pueden atravesar efectivamente las células del epitelio del intestino delgado para llegar al torrente sanguíneo, y c) el fármaco puede ser inactivado en el hígado en su camino hacia la circulación sistémica.

#### **2.2.2 Vía parenteral**

Parental se refiere a la introducción de sustancias en el cuerpo por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa e intra-arterial. Su acción es rápida, es predecible, casi completamente biodisponible y evita el primer paso. Provee una vía alterna o buena de administración de fármacos en pacientes muy enfermos o

## Teoría general

---

en estado de coma, para quienes la administración oral no es posible. Entre sus limitantes se pueden mencionar: a) la inyección no es un método ideal de administración de fármacos debido al dolor producido, y b) las inyecciones tienen limitaciones para entregar productos proteicos, particularmente para aquellos que requieren un nivel de sostenido de su concentración (liberación prolongada).

Se presenta aquí una breve descripción de varios tipos de inyecciones:

### Inyección vía subcutánea:

Introduce el fármaco a una capa subcutánea del tejido adiposo utilizando una aguja hipodérmica. Por esta vía de administración se pueden entregar predeciblemente y controlablemente macromoléculas y péptidos. La inyección subcutánea presenta usualmente una más baja velocidad de absorción y más lenta acción, que las inyecciones por las vías intramuscular o intravenosa.

Una de las desventajas de esta vía, es que la velocidad de absorción es difícil de controlar en el depósito subcutáneo.

### Inyección vía intramuscular:

Esta vía entrega el fármaco en los músculos del esqueleto, usualmente en los músculos gluteales o deltoides. El efecto del fármaco es más rápido que el observado en la inyección subcutánea pero más lento que el efecto producido por la vía intravenosa. La velocidad de absorción varía de acuerdo a las propiedades químicas de la solución inyectada y variables fisiológicas como la irrigación de sangre en el músculo y la actividad muscular. Algunas desventajas de esta vía son: a) la limitación de la cantidad inyectada de acuerdo a la masa muscular disponible, y b) la degradación de péptidos en el sitio de la inyección.

### Inyección vía intravenosa:

Esta involucra una inyección de un líquido acuoso a una vena superficial o una infusión continua vía una aguja o un catéter localizada en una vena superficial o profunda. Este es el único método de administración disponible para algunos fármacos y es la escogida para situaciones de emergencia, porque el comienzo de la acción farmacológica es más rápida después de su inyección. Teóricamente,

no se presentan pérdidas del fármaco, y se requieren dosis pequeñas en comparación con otras vías de administración. La velocidad de infusión puede ser controlada para una administración continua y prolongada. Las partículas de la solución intravenosa se distribuyen en varios órganos dependiendo de su tamaño. Las partículas con un tamaño mayor a  $7.0\ \mu\text{m}$  (7000 nm) son atrapadas en los pulmones y aquellas menores a  $0.1\ \mu\text{m}$  (100 nm) se acumulan en la medula ósea. Las partículas entre  $0.1$  y  $7.0\ \mu\text{m}$  (100-7000 nm) se van hacia el hígado y el bazo.

Una de las desventajas de esta vía es que pueden ocurrir algunas reacciones inmunológicas después de inyectar proteínas y lípidos. [Jain 2008].

### Inyección vía intra-arterial:

Es la inyección directa en las arterias, no es una vía usual para la administración de fármacos terapéuticos. La mayoría de las inyecciones intra-arterial o difusiones arteriales vía catéter localizado en una arteria son para quimioterapia de algunos órganos y extremidades. La quimioterapia administrada por esta vía, se utiliza principalmente para combatir tumores malignos en el cerebro.

### **2.2.3 Vía transdermal**

Esta vía se utiliza para la entrega de fármacos con usos terapéuticos a través de la piel, es una alternativa a las rutas oral, parenteral y transmucosal.

### **2.2.4 Vía transmucosal**

La membrana mucosa cubre todas las cavidades y orificios del cuerpo, los fármacos pueden ser introducidos en varios sitios anatómicos. Por ejemplo, bucal, nasal y rectal. El movimiento de penetración a través de la membrana mucosa es por difusión. Comparando con la ruta oral y transmucosal, esta última vía es de más rápida absorción. Esta vía evita el primer paso de metabolismo por el hígado.

### Vía Bucal o Sublingual:

La vía de administración de fármacos bucal o sublingual presenta una absorción rápida hacia la circulación sistémica con un comienzo rápido del efecto del fármaco. Esta vía evita el primer paso metabólico hepático. Una de las desventajas, puede presentarse cuando hay producción excesiva de saliva y se produce una disolución muy rápida de la forma farmacéutica, lo cual puede llevar a su deglución y un retraso en la absorción.

### **2.2.5 Vía nasal**

Los fármacos se administran para tener un efecto local o sistémico. La ruta intranasal es una opción para los fármacos que no se pueden administrar oralmente, las dosis son pequeñas y la entrada a la circulación es rápida. La velocidad de difusión de los compuestos se da a través de las membranas mucosas nasales, probablemente se da vía los canales acuosos de la membrana. Por lo tanto si el fármaco está en solución y el tamaño molecular es pequeño, el fármaco será absorbido rápidamente. Algunos inconvenientes serían a) la dosis es limitada por el área relativamente pequeña para la absorción, y b) esta vía no es para todos los fármacos. Los fármacos polares y algunas macromoléculas no son absorbidos en la cantidad suficiente por la pobre permeabilidad de la membrana; también pueden depurarse rápidamente, o degradarse enzimáticamente dentro de la cavidad nasal.

### **2.2.6 Vía rectal**

El colon es un sitio apropiado para la absorción lenta y segura de fármacos que están destinados para el intestino grueso o que están destinados para actuar sistemáticamente. La absorción del fármaco varía de acuerdo a si está dirigido al colon superior, al colon inferior o al recto. Una de las desventajas es que algunos

fármacos hidrofílicos como los antibióticos o péptidos no son absorbidos fácilmente desde el recto.

### **2.2.7 Vía pulmonar**

Recientemente ha crecido el interés para utilizar esta vía para una liberación sistémica del fármaco. Ya que tiene altas posibilidades de ser un portal para la entrada de péptidos y ser factible para la terapia con genes. Los pulmones tienen una gran área disponible para la absorción del fármaco. Evitan el primer paso metabólico hepático y requiere dosis pequeñas en comparación con la vía oral para alcanzar los efectos terapéuticos. Algunas desventajas son: a) solo 10.0 al 40.0% del fármaco que sale del dispositivo inhalante se deposita en los pulmones, y b) la capa mucosa del sistema respiratorio desecha las partículas hacia la garganta.

### **2.2.8 Vía cardiovascular**

Los fármacos pueden ser introducidos por esta vía para lograr un efecto sistémico o para ser dirigido hacia un órgano a través del flujo sanguíneo local. Algunos dispositivos pueden ser implantados por cirugía mientras que otros se insertan por procedimientos menos invasivos como la cateterización.

### **2.2.9 Vía intra-médula ósea**

Las sustancias inyectadas por esta vía son absorbidas casi inmediatamente a la circulación sistémica. La ventaja de esta vía es que la cavidad de la médula funciona como una vena rígida que no se colapsa, a diferencia de las venas en mala condición del paciente.

### 2.3 Nanosistemas de liberación de fármacos

Dentro del área de la nanotecnología (o más propiamente dicho “nanociencia”) se encuentra la nanomedicina, la cual se encarga sobre intervenciones específicas médicas a escala molecular para diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades [Park 2007]. Hay que mencionar que el término nanotecnología usualmente se refiere a investigaciones realizadas a una escala de 100 nm o menos, sin embargo los sistemas de liberación de fármacos cubren un intervalo que abarca desde nanosistemas a macropartículas 100  $\mu\text{m}$  (100,000 nm), en este sentido práctico la nanotecnología incluye la microtecnología.

Los nanosistemas de liberación de fármacos son una parte del área de nanomedicina. Como ya se ha mencionado, el concepto de “liberación de fármacos” no está limitado a la prolongación del tiempo de liberación del fármaco sino que también se refiere a un control temporal en donde se selecciona una cinética predeterminada de una liberación de fármaco durante el tratamiento, y a un control de distribución espacial que dirige a un vehículo con fármacos al sitio de acción deseado. Para lograr tales controles y explorarlos, la nanotecnología requiere de enfoques multi-disciplinarios que provienen de la química, la biología y la ingeniería.

En 1964 Folkman and Long publicaron el primer descubrimiento original de un sistema liberación de fármacos polimérico [Folkman *et al.*, 1964], desde entonces se han aprovechado las propiedades únicas de los polímeros y ha surgido una nueva generación de nano materiales poliméricos para la liberación de fármacos [Kabanov y Batrakova 2008]

Con el desarrollo de nuevos nanosistemas, los investigadores se han percatado de la importante relación que existe entre la arquitectura y las propiedades fisicoquímicas de los polímeros. La arquitectura de los polímeros describe la forma global de una sola molécula polimérica. [Qiu *et al.*, 2006]. Una vez elegida la arquitectura deseada, es recomendable realizar la selección

adecuada de los monómeros, así como de reactivos, solventes y método de polimerización a utilizar, lo cual puede ofrecer varias ventajas debido a las propiedades del material sintetizado. Entre las características más sobresalientes que se buscan en estos materiales para usarse como sistemas de liberación de fármacos son una elevada biocompatibilidad y una reducida o nula citotoxicidad.

Hay otra serie de características o criterios que dependiendo de la arquitectura de las partículas, mejoran la liberación del fármaco y pueden disminuir los efectos adversos:

a) la estabilidad de los nano/microgeles para una circulación prolongada en el torrente sanguíneo.

b) la superficie debe tener una funcionalidad para futuras interacciones con ligandos específicos que puedan reconocer el receptor de la célula dañada.

c) el tamaño en general también es importante ya que aquellas partículas que oscilan entre 5-250 nm son las de mayor interés en la liberación [Alexis *et al.*, 2008]. Las partículas menores de 200 nm de diámetro pueden ser más fácilmente introducidas por endocitosis a la célula, y se reducen las posibilidades de que sean destruidas por las células fagocíticas; y por último,

d) la biodegradabilidad de las partículas, éstas aparte de liberar el fármaco en un periodo de tiempo deseado, deben poder ser fácilmente eliminadas una vez que han liberado el fármaco. [Oh *et al.*, 2008]

Recientemente, se han incrementado los estudios sobre polímeros que responden a estímulos del ambiente debido al amplio espectro de aplicaciones que pueden tener; por ejemplo como transportadores en la liberación controlada de fármacos, a estos polímeros se les conoce como “polímeros inteligentes”. Entre los estímulos más importantes cuyo efecto que se ha estudiado ampliamente, están la temperatura, los cambios en pH y la salinidad. [Ballauff y Lu 2007; Medeiros *et al.*, 2010].

En el caso de nano/microgeles y micelas que presentan una LCST alrededor de 41°C, esto permite una reducción o aumento en el tamaño de la

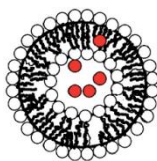
partícula al cambiar la temperatura a 37°C, que es la temperatura prevaleciente en el torrente sanguíneo; cuando la temperatura se aproxime a 41°C, por ejemplo, como en una célula tumoral, se contaría así con un mecanismo de liberación del fármaco. En el caso de que se presente una reducción del tamaño, el fármaco saldría expulsado. Por ejemplo, está el caso de PNIPAAm la cual exhibe una LCST de alrededor de 32°C.

Investigaciones han mostrado que la mayoría de los tumores sólidos tienen conductos sanguíneos con defectos en su estructura y usualmente producen una cantidad excesiva de varios factores de permeabilidad vascular. Por lo tanto muestran mayor permeabilidad vascular, lo cual asegura la introducción de oxígeno y nutrientes al tumor para su rápido crecimiento. Este defecto facilita el transporte de macromoléculas al interior de los tejidos cancerígenos. [Maeda 2001; Gaumet et al., 2008; Fang *et al.*, 2011]

Algunos parámetros de nanomateriales que influyen en la actividad biológica son: el tamaño de partícula, la distribución de tamaños, el área superficial, la carga superficial, la funcionalidad de la superficie, la forma, el estado de agregación; así como la estabilidad y distribución de componentes tales como: terapéuticos, de imagen y de dirección. [McNeil 2011]

A continuación se da una breve descripción de nanosistemas con potencial para liberar fármacos.

### 2.3.1 Liposomas



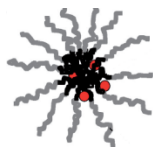
Desde que Gregoriadis y su equipo propusieron a los liposomas como vehículos de fármacos en 1971, se han estudiado ampliamente [Gregoriadis *et al.*, 1971; Soo *et al.*, 2009]

Los liposomas son estructuras vesiculares, usualmente compuestos de una bicapa de lípidos multilamelar o unilamelar, preparados a partir de materiales básicos, como fosfolípidos y colesterol. Los liposomas han sido extensamente estudiados desde la década de 1980 para la liberación de fármacos en el sistema

nervioso central (CNS) mostrando un incremento en la eficacia del fármaco y una reducción en su toxicidad. Una limitante considerable de los liposomas es su baja capacidad relativa para el cargado de fármacos insolubles en agua y de biomacromoléculas [Kabanov y Batrakova, 2008], otras limitaciones incluyen problemas relacionados a la estabilidad, la incapacidad de entregar en el sitio correcto y la incapacidad de liberar el fármaco cuando llega al sitio requerido. Las propiedades de los liposomas varían substancialmente dependiendo de la composición de lípidos, el tamaño, la carga superficial, y el método de preparación [Jain 2008].

Los liposomas preparados para administración por vía intravenosa, miden usualmente menos de 200 nm de diámetro [Gabizon *et al.*, 2007; Soo *et al.*, 2009]. Los liposomas convencionales son depurados rápidamente de la circulación por el sistema retículo endotelial. Los liposomas con diámetros menores a 100 nm son depurados más lentamente, igualmente, la modificación de la superficie de los liposomas con polímeros hidrosolubles como el poli(etilenglicol) (PEG) puede reducir su adhesión a proteínas plasmáticas, lo cual decrece el reconocimiento y la remoción rápida de los liposomas de la circulación por los fagocitos mononucleares del hígado y bazo.

### 2.3.2 Micelas poliméricas



En 1984, Ringsdorf y su grupo, publicaron uno de los primeros artículos sobre el uso de copolímeros en bloque para la liberación de fármacos [Bader *et al.*, 1984; Soo *et al.*, 2009]. El uso de micelas como transportadores para la liberación de fármacos de bajo peso molecular (proteínas, etc.) son ensamblajes de tamaño nanométrico (10 a 100 nm de diámetro) de copolímeros anfifílicos en bloques lineales o ramificados, que se forman por interacciones electrostáticas fuertes y puentes de hidrógeno. La estructura y la morfología del núcleo y la coraza de las micelas determinan en gran medida las propiedades y aplicaciones de las mismas [Xiong *et al.*, 2008;

Hayashi et al., 2004]. Los bloques hidrófobos se agregan en soluciones acuosas formando un núcleo hidrófobo, y los bloques hidrofílicos forman una coraza protectora hidrofílica. Las micelas son termodinámicamente estables, siempre y cuando su concentración exceda la CMC (la concentración micelar crítica), así se evita el regreso a un estado en donde hay a cadenas individuales.

Una de las desventajas de las micelas poliméricas es que se desintegran después de diluirse en los fluidos corporales, resultando en una liberación temprana del fármaco. El problema de desintegración se ha mitigado mediante el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, y estas micelas entrecruzadas resultan más resistentes a cambios ambientales tales como: el pH, la concentración iónica, la composición del solvente y la desintegración de su estructura [Bontha *et al.*, 2006]

Las micelas farmacéuticas pueden ser administradas a través de varias rutas, tales como la vía parental, nasal, ocular y ótica [Manoharan *et al.*, 2010]

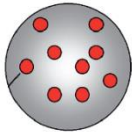
### 2.3.3 Dendrímeros



El término dendrímero es derivado de las palabras griegas “dendra” de árbol y “meros” de parte. Tiene 3 componentes estructurales: un núcleo multifuncional central, unidades ramificadas, y grupos superficiales, las capas repetidas se llaman “generaciones” [Aulenta et al., 2003; Qui *et al.*, 2006]. Los sistemas de liberación de fármacos con dendrímeros han sido diseñados para ser administrados vía oral, ocular y transdermal. Las aplicaciones de estos dendrímeros van desde la liberación de fármacos anticancerígenos, antivirales, antibacteriales, a vacunas de ADN y agentes de contraste para resonancias magnética nuclear. Los dendrímeros han probado ser no-inmunogénicos y tienen baja toxicidad para mamíferos, especialmente cuando su superficie ha sido modificada con grupos aniónicos o neutrales, como grupos carboxílicos o grupos hidroxílicos. La biocompatibilidad o bioseguridad de los dendrímeros *in vivo* depende de su carga eléctrica. En

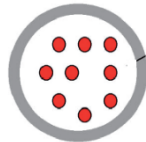
general, sin importar su estructura, los dendrímeros catiónicos fueron hemolíticos y citotóxicos, aún en bajas concentraciones [Malik *et al.*, 2000]

### 2.3.4 Nanopartículas



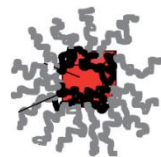
Las nanopartículas son especies sólidas de tamaño nanométrico usualmente compuesto de un polímero insoluble y biodegradable o de una mezcla de polímeros. Se han venido estudiando y desarrollado desde la década de 1990 como transportadores de fármacos y genes. Para permitir la eficacia de transcitosis a través de las células endoteliales de los microvasos cerebrales (BMVEC), el tamaño de partícula debe mantenerse pequeño y no exceder 100-200 nm [Kabanov y Batrakova 2008]. Se ha mejorado el transporte del Dox en nanopartículas hacia el cerebro evadiendo los sistemas de P-glicoproteínas y de las proteínas de eflujo de fármacos (MRP) presentes en la barrera hematoencefálica, los cuales impiden la entrada del fármaco solo. [Wong *et al.*, 2006; Gottesman *et al.*, 2002]

### 2.3.5 Nanoesferas



Son partículas huecas de tamaño nanométrico [Kabanov y Batrakova 2008] La vía de administración más ventajosa para estos sistemas de liberación de fármacos es la parental. Estas nanoesferas se introducen más fácilmente que el fármaco libre, ya que por su tamaño se incorporan fácilmente a vacuolas mediante la fagocitosis [Sáez *et al.*, 2004]

### 2.3.6 Nanosuspensiones



Estos sistemas representan partículas cristalinas de fármacos hidrofóbicos sólidos, los cuales son estabilizados por surfactantes que contienen PEG no iónico [Jacob *et al.*, 2000; Kabanov y Batrakova 2008]. Una suspensión farmacéutica es definida como una partícula

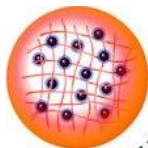
farmacéutica sólida muy fina y dispersa en un vehículo acuoso para uso oral y tópico o para una administración parental o pulmonar. La distribución de tamaño de la partícula de las nanosuspensiones es usualmente menor a un  $\mu\text{m}$ , teniendo un tamaño promedio que oscila entre 200 y 600 nm. [Chingunpituk 2007; Mukesh 2012]

### 2.3.7 Nanofibras y nanotubos



Hay varios tipos de nanofibras y nanotubos sintéticos hechos de carbono, sílice o de diversos polímeros naturales o sintetizados. Claramente, la toxicidad de estos materiales depende de su tamaño, forma, área superficial y la química intrínseca de los materiales. Estos materiales son candidatos para ser empleados como vehículos de liberación de fármacos y de genes. [Tran *et al.*, 2009]

### 2.3.8 Nanogeles/microgeles



El término nanoescala comprende a tamaños que están dentro del rango de 1 nm a 100 nm [BSI 2011]. Por lo tanto, los nanogeles son nanopartículas de hidrogeles de tamaño nanométrico menores a 100 nm con estructura de red tridimensional de cadenas poliméricas entrecruzadas [Sasaki *et al.*, 2010]. Sin embargo, por motivos de aplicación, los nanogeles abarcan también la microescala. Algunos autores se refieren a los nanogeles con dimensiones de 10-1000 nm [Ho *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2011]. Algunos nanogeles muestran una respuesta rápida a factores microambientales tales como la temperatura y pH debido a sus dimensiones de escala nanométrica. Los nanogeles se pueden clasificar en categorías de acuerdo a su estructura entrecruzada: a) nanogeles entrecruzados químicamente o por enlaces covalentes y en b) nanogeles entrecruzados físicamente o por enlaces no covalentes. Los que se entrecruzan covalentemente tienen mayor integridad que los que no lo son. Los nanogeles pueden ser fabricados a escalas nanométricas a

través de diversas técnicas, como lo son la nanolitografía, los nanofluidos, y las emulsiones. [Fisher et al., 2009; Kabanov et. al 2009]

Los nanogeles tienen gran potencial como sistemas de liberación de fármacos por su alta capacidad de cargado, su alta estabilidad y respuesta a factores ambientales, lo cual no es típico de otros sistemas comunes de nanotransporte. Esta familia de materiales en nanoescala ha atraído mucho la atención para la liberación de fármacos, biomacromoléculas y agentes de contraste de imágenes. Varios nanogeles han mostrado que pueden liberar su carga útil al interior de las células y que pueden atravesar diversas barreras biológicas. En general, estos materiales han demostrado tener un gran potencial para la liberación sistémica de fármacos, ya que mejoran la biodisponibilidad oral y cerebral de farmacos de bajo peso molecular y de biomacromoléculas [Kabanov et al, 2009; Choi et al., 2010]

En 1973 Tanaka descubrió la transición de fase de los geles. Se conoce que los geles poliméricos existen en dos fases distintas, hinchadas y colapsadas. La transición de volumen ocurre entre las fases, ya sea continuamente o discontinuamente en respuesta a un estímulo químico o físico tales como la temperatura, la composición del solvente, el pH, la composición iónica, campo eléctrico, etc. Para que un gel sufra una transición de fase es necesario que el polímero interactúe con uno a otro a través de interacciones de repulsión y atracción. Hay varios tipos de geles que sufren una transición de fase en el volumen, a continuación se menciona algunos.

Geles sensibles a la luz: son geles que contienen una molécula que responde a cierta cantidad de luz. [Tanaka 1992]

Geles termo-sensibles: los geles que contienen polímeros que presentan puentes de hidrogeno e interacciones de Van del Waals, muestran una dependencia a la temperatura. Estos geles termo-sensibles son ampliamente usados para sistemas de liberación.

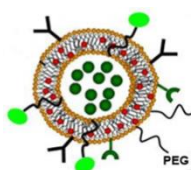
Geles sensibles a solventes: estos geles al variar la composición del solvente de 0.0% a 100.0% sufren una transición de fase, lo mismo sucede si se usa como variable a la temperatura o pH.

Geles sensibles a iones y pH: estos responden a cambios de concentración iónica y a cambios de pH.

Geles sensibles a campo eléctrico: el efecto más importante al parecer se debe a la migración y redistribución de iones y contraiones dentro del gel.

Geles sensibles bioquímicamente: al entrar ciertas moléculas al gel, estas forman un complejo o se convierten en otras moléculas, las cuales desestabilizan el gel, induciendo el hinchamiento o colapso de éste.

### 2.4 Nanosistemas de liberación dirigidos



Los sistemas dirigidos de liberación de fármacos o agentes dirigidos se refiere a transportadores de fármacos que se aglomeran o concentran selectivamente en un sitio blanco a través de liberación local o a través de la circulación sanguínea, el concepto de agentes dirigidos fue propuesto por Ehrlich P. en 1906 [García-Sánchez *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009] Existe un amplio espectro de moléculas propuestas como candidatos para ser utilizados en las nanopartículas dirigidas: hormonas, carbohidratos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, epítopes etc.

#### 2.4.1 Agentes-inmuno dirigidos

Estos pueden ser conjugados con anticuerpos en su superficie. Ejemplo un inmunoliposoma: Docetaxel liposoma, constituida por lecitina de soya, colesterol y un anticuerpo monoclonal anti-CEA, siendo su sitio de acción un tumor.

### **2.4.2 Agentes glicolípidos modificados dirigidos**

Estos contienen carbohidratos de distintas densidades en su superficie. Por ejemplo los agentes que contengan residuos de galactosa pueden ser tomados por células del parénquima hepático y los que contienen residuos de manosa pueden ser tomados por las células K.

### **2.4.3 Agentes magnético-dirigidos**

Estos pueden contener mezclas ferromagnéticas, usualmente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , estos agentes magnéticos pueden ser acumulados en el área del tejido blanco por un campo magnético.

## **2.5 Descripción breve de los reactivos principales empleados en este trabajo.**

### **2.5.1 Iniciadores**

Los radicales libres son especies químicas independientes, que poseen un electrón desapareado, lo cual los hace altamente reactivos y con tiempos de vida media muy cortos. Las polimerizaciones por radicales libres, son polimerizaciones en cadena en las cuales cada molécula polimérica crece por la adición de un monómero al sitio reactivo terminal del radical libre, también conocido como centro activo, después de la adición del monómero, el centro activo es transferido al final de la nueva cadena terminal creada. La polimerización de radicales libre es el método más ampliamente utilizado para la preparación de polímeros, habitualmente estas reacciones pueden ser divididas en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. [Young y Lovell 2011]

Es en la etapa de iniciación donde se da la creación del centro activo de los radicales libres, usualmente este proceso se lleva a cabo en dos etapas: en la primera etapa se forma el radical libre a partir de un iniciador y en la segunda etapa se adiciona uno de estos radicales libres a una molécula de monómero.

## Teoría general

Hay dos mecanismos químicos principales mediante los cuales se pueden generar radicales libres: 1) por rompimiento homolítico (homólisis) de un enlace sencillo y 2) por transferencia de un electrón desde un ion o molécula (reacciones redox). Existen varias formas para dar inicio a las reacciones de generación de radicales libres: con energía térmica, por fotólisis, por reacciones redox, por irradiación, por electroquímica, entre otros), e igualmente existen varios tipos de iniciadores (peróxidos, persulfatos, compuestos azo, entre otros); en este trabajo se emplearon cuatro iniciadores térmicos (dos persulfatos y dos compuestos azos). En la Tabla 1, hemos detallado sus principales propiedades y en la Figura 1 se muestra sus estructuras.

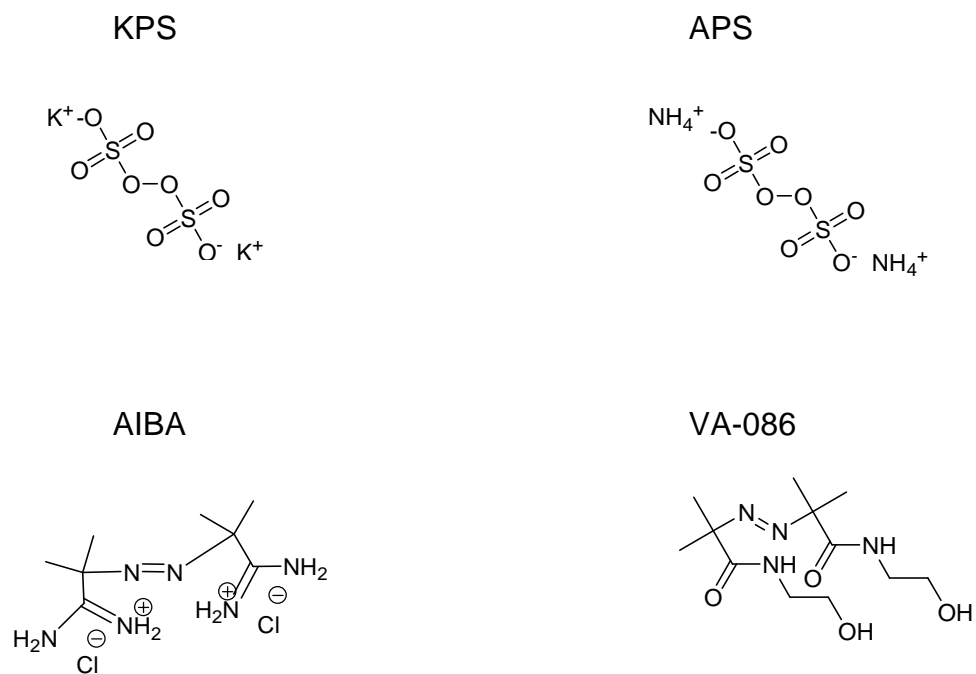


Figura 1. Estructura correspondiente a los iniciadores utilizados.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los iniciadores que se emplearon en la síntesis de nano/microgeles.

Iniciador térmico por radicales libres	Solubilidad (g/L agua, 20°C)	Peso molecular (g/mol)	t ½ (h)	Radical
KPS	50	270.32	10 (60°C)	inorgánico, aniónico
APS <sup>d</sup>	620	228.26	191 (50°C) 38.5 (60°C)	inorgánico, aniónico
AIBA / V-50 <sup>e</sup>	232 <sup>a</sup>	271.2	1 (85°C) 10 (50°C) <sup>b</sup>	orgánico, catiónico
VA-086	45 <sup>c</sup>	288.35	10 (86°C) <sup>b</sup>	orgánico, no iónico

Nota: Los superíndices corresponden a las siguientes cibercitas; [cibercita, a], [cibercita, b], [cibercita, c], [cibercita, d], [cibercita, e]

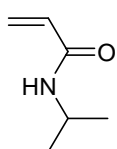
### 2.5.2 Monómeros

Anteriormente se explicó la primera etapa de la polimerización por radicales libres, a continuación se da una breve descripción de la segunda etapa llamada propagación. Esta etapa involucra el crecimiento de la cadena polimérica mediante la adición rápida y secuencial de los monómeros en el sitio activo. Existen dos posibles formas de propagación: adición cabeza-cola, o adición cabeza-cabeza.

La adición cabeza-cola es la que comúnmente predomina, el tiempo requerido para la adición de cada monómero es típicamente de milisegundos.

La última etapa es la terminación, la cual se inicia con la desaparición del centro activo. [Rodríguez et al., 2003]

#### NIPAAm

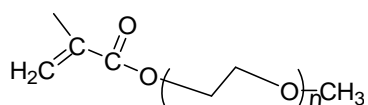


Los polímeros sintetizados con este monómero son sensibles a cambios de temperatura, y han sido de los más utilizados en investigaciones sobre aplicaciones biomédicas, especialmente en estudios de liberación controlada de fármacos. El PNIPAAm tiene un LCST de 32°C, por debajo de esta temperatura se comporta como una molécula hidrofílica,

por lo tanto se hincha al absorber grandes cantidades de agua. Por arriba de esa temperatura cambia su comportamiento a hidrofóbico, expulsando el agua y por consiguiente reduciendo su tamaño, tal propiedad es ideal para liberar un fármaco de un sistema polimérico. En otras palabras, abajo del LCST las cadenas poliméricas son solubles en agua debido a la formación de múltiples puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las amidas laterales en la cadena. Cuando la temperatura aumenta, el polímero sufre una transición de fase de volumen. [Ballauff y Lu, 2007]

En algunos estudios de citotoxicidad se ha demostrado la citocompatibilidad del PNIPAAm, en contraste, también se ha demostrado la citotoxicidad del monómero NIPAAm a bajas concentraciones [Wadajkar *et al.*, 2009]

### PEGMA



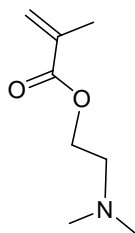
El Poli(etilenglicol) (PEG) no es solamente un componente con importancia biológica, sino que también actúa como estabilizador estérico. Cuando se generan dispersiones de látex mediante polimerización por dispersión, y en ausencia de cualquier estabilizante, estas partículas resultan inestables y pueden aglomerarse durante en su formación. (Leobandung *et al.*, 2002)

Para prevenir la eliminación por fagocitos del RES (Sistema retículo-endotelial) la estrategia más comúnmente usada es la conjugación de PEG a la superficie de las proteínas o nanopartículas. (Fang *et al.*, 2011)

Cuando se utiliza la polimerización por emulsión es difícil remover los emulsificantes debido a que están fuertemente asociados a las partículas formadas. La polimerización por emulsión libre de detergente resuelve este problema al estabilizar la reacción de polimerización con macrómeros que exhiben las propiedades típicas de los surfactantes convencionales, pero también tienen un grupo insaturado reactivo, el cual permite al macrómero ser incorporado en la superficie de la partícula polimérica por copolimerización con otros

comonómeros. Uno de estos macrómeros es el PEGMA, el cual confiere propiedades únicas para aplicaciones biomédicas: estabilidad, biocompatibilidad y prolongación del tiempo de circulación en la sangre. (Oishi *et al.*, 2007; Serrano-Medina *et al.*, 2012)

### DMAEM



Es el monómero de metacrilato con grupos amina más usado en procesos industriales, los polímeros derivados de sus sales son usados para tratamientos de agua, extracción de aceite y en la producción de papel. [Kuznetsova *et al.*, 2003].

El PDMAEM es un polímero catiónico soluble en agua, el cual es capaz de interactuar con el DNA electrostáticamente. El PDMAEM tiene una amina terciaria con un pKa alrededor de 8.0, así que la mayoría se encuentran protonadas en condiciones fisiológicas. En el trabajo del grupo de Wetering se ha reportado un potencial Z positivo en complejos de plásmidos con PDMAEM, y el potencial Z se va incrementando en función al radio (polímero/plásmido w/w); se encontró un máximo a una proporción de 4/1 w/w en donde el potencial Z (33 mV) ya no aumentaba y un mínimo ( $pZ=15$  mV) a una relación de 1/1 w/w. En este caso el PDMAEM se encontraba formando un complejo con el plásmido. [Wetering *et al.*, 1997]

Los nanogeles entrecruzados catiónicos han sido propuestos como sistemas de liberación para polifosfatos tales como el pDNA, los oligonucleótidos antisentido, y en la liberación de genes o análogos de nucleósidos en quimioterapia. La adición de PEI y PEG permite reducir su toxicidad y tamaño. [Vinogradov y Kabanov 1999]

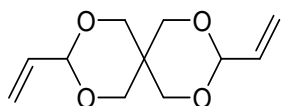
Diversos autores han reportado que los nanogeles catiónicos de P[NIPAAm/DMAEM] presentan una LCST de 33-36°C, pero se agregan a temperaturas mayores. Y la estabilidad del polímero es sensible al cambio de la fuerza iónica a bajo pH. [Moselhy *et al.*, 2009]

En otro estudio sobre la síntesis de nanogeles catiónicos pegilados de PDMAEM se reportó que el tamaño depende fuertemente de la concentración del monómero y del tipo de iniciador. Por ejemplo al usar iniciador 4,4'-Azobis (ácido cianoaléxico) "V501" obtuvieron un tamaño de 10nm de radio hidrodinámico y su potencial zeta fue de alrededor de +30 mV. [Yan y Tao 2010]

### 2.5.3 Entrecruzantes

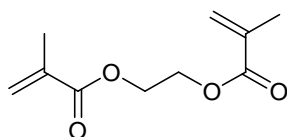
En una co-polimerización por dispersión libre de detergente del poli(quitosan-co-NIPAAm/MAA-co-MMA) se observó que las partículas de núcleo-coraza con un alto grado de entrecruzamiento presentaban una razón de hinchamiento mayor en condiciones ya sean ácidas o básicas, debido a que conforme se aumentó la concentración del agente entrecruzante se pudo bajar la conversión de la primera etapa de la reacción y se aumentó la conversión en la segunda etapa de la reacción. Los autores concluyeron que al incrementar la relación en peso del quitosan/NIPAAm, el tamaño de la partícula del núcleo-coraza disminuía, y la razón de hinchamiento de la muestra se incrementaba. [Lin *et al.*, 2005]

#### DVA



Es un agente entrecruzante lábil en ácido, el DVA ha sido empleado para generar nanopartículas de núcleo-coraza termosensibles, es estable a la degradación a pH=6.0 y 8.2, las micelas resultantes de núcleo entrecruzado se hidrolizan en co-polímeros en bloques bien definidos a pH bajos (30 min y 12 h, a pH=2.0 y 4.0 respectivamente) [Zhang *et al.*, 2008].

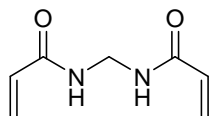
#### EGDMA



El EGDMA es el entrecruzante más ampliamente usado en lentes de contacto. La molécula contiene dos grupos metacrilato, los cuales pueden ser polimerizados en cadenas

poliméricas distintas, así se mantienen unidas las dos.

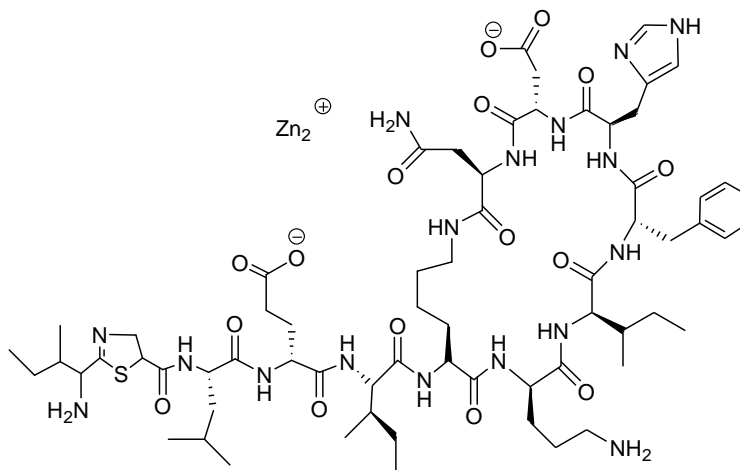
### MBA



El MBA es un monómero bifuncional, con dos dobles enlaces idénticos, usado ampliamente como entrecruzante en muchos campos de aplicación.

### 2.5.4 Bacitracina

La bacitracina es un antibiótico producido por cepas de Tracy de la bacteria *Bacillus subtilis*, la cual fue aislada de la tibia de una niña llamada Tracy. El antibiótico inhibe la formación de la pared celular de bacterias Gram positivas. La bacitracina es tóxica para los riñones, por lo cual no se indica por vía oral ni sistémica. En preparados con zinc y otros antibióticos, se usa como ungüentos para el tratamiento tópico de una

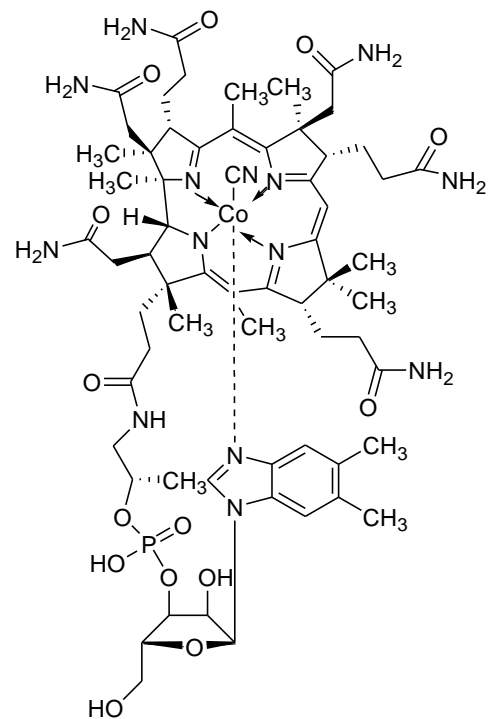


Bacitracina (sal de zinc)

variedad de infecciones de la piel, ojos y prevención de infecciones en heridas. En este trabajo de investigación se empleó por su color, y así seguir más fácilmente los estudios de cargado y liberación.

### 2.5.5 Vitamina B12

También se le conoce como cobalamina, es esencial para que nuestro organismo pueda sintetizar glóbulos rojos. El sistema nervioso, el corazón y el cerebro no desarrollan bien sus funciones, si la cobalamina no se encuentra en los niveles adecuados. La vitamina B12 es obtenida a través de las proteínas de los alimentos de origen animal, durante el proceso digestivo, para ello es necesaria la participación de las enzimas del jugo gástrico y de un componente llamado factor intrínseco.



Vitamina B12

### 2.6 Síntesis de nano/microgeles.

Existen varias estrategias sintéticas para la preparación de nano/microgeles.

A) Para sintetizar nanogeles entrecruzados físicamente se cuentan con las técnicas siguientes: a) nanogeles autoensamblados; formados por asociación de polímeros anfifílicos, estos nanogeles pueden atrapar proteínas en su matriz. b) nanogeles autoensamblados formados por varias asociaciones de polímeros, éstos pueden actuar como chaperones atrapando a proteínas desnaturalizadas por el calor y posteriormente ayudarlas a recuperar su estructura tridimensional funcional. [Sasaki *et al.*, 2010]

B) Otros métodos químicos para la síntesis de nanogeles son: los métodos fotolitográficos, el método micromoldeo, el método de microfluidos, y el método de polimerización heterogénea por radicales libres (dispersión, precipitación, mini emulsión inversa y microemulsión inversa). También se ha utilizado la polimerización por radicales libres controlada/viviente en medio heterogéneo para preparar nano/microgeles bien definidos con propiedades únicas para la liberación de fármacos. [Oh *et al.*, 2008]

Se describen a continuación los métodos de polimerización heterogéneos por radicales libres, en donde las reacciones se llevan a cabo con monómeros hidrofílicos o solubles en agua en presencia ya sea de un entrecruzante difuncional o multifuncional. Este tipo de reacciones son las más ampliamente utilizadas para preparar microgeles sintéticos bien definidos.

### **2.6.1 Polimerización por dispersión**

Las ventajas de la preparación de nanopartículas con el método de polimerización por dispersión incluyen: 1) una alta velocidad de reacción para la polimerización simple por dispersión por radicales libres, 2) la eliminación de solventes orgánicos del sistema y 3) la habilidad de producir sistemas de partículas esféricas monodispersas. En aplicaciones médicas la ausencia de solventes orgánicos en el sistema elimina la preocupación de la toxicidad ligada a los solventes.

El solvente utilizado deberá ser termodinámicamente compatible con el monómero, el iniciador y estabilizador estérico. La mezcla de la reacción debe ser homogénea al principio y la polimerización debe iniciarse en esta solución. Sin embargo, para que el proceso de dispersión pueda ser concretado, este mismo solvente debe ser un solvente pobre termodinámicamente para los oligómeros y el polímero formado. Durante el curso de la reacción, el solvente pasa de ser un medio para la disolución a un medio dispersante, y esto resulta en la precipitación de las cadenas del polímero para formar un núcleo de reacción. Además, los monómeros y oligómeros difunden hacia el núcleo de reacción, y la

reacción continúa adentro. Dependiendo de la compatibilidad del medio (Solvente) con los oligómeros y polímeros resultantes, puede ocurrir una separación de fases en la etapa primaria, llevando a un control del tamaño de partícula. Hay varios factores que juegan un papel importante en el control de la cinética, la estabilidad coloidal, el tamaño de partícula y el peso molecular durante la polimerización por dispersión, entre esos factores se encuentran: 1) el surfactante o el estabilizante, 2) el monómero, y 3) el tipo de iniciador utilizado. [Leobandung *et al.*, 2003]

### **2.6.2 Polimerización por precipitación**

Es similar a la polimerización por dispersión ya que involucra la formación de una mezcla homogénea en su etapa inicial, la iniciación y polimerización se lleva en solución homogénea. Debido a que cuando los polímeros se van formando no se hinchan pero si son solubles en el medio, es necesario el uso de un entrecruzante para unir las cadenas poliméricas para que las partículas se aislen unas de otras. Por consecuencia, las partículas entrecruzadas por lo general tienen una forma irregular con alta polidispersidad (PDI). [Oh *et al.*, 2008]

### **2.6.3 Polimerización por mini-emulsión inversa**

Es un proceso de polimerización en agua/aceite (W/O) ya que contiene gotas acuosas dispersas, estabilizadas con la ayuda de surfactantes insolubles en agua, en un medio orgánico. Las dispersiones estables se forman con agitación mecánica por un proceso de emulsión inversa, que genera zonas de polimerización por mini-emulsión inversa. Después de la adición de los iniciadores de radicales, la polimerización ocurre dentro de las gotas acuosas produciendo partículas coloidales.

### **2.6.4 Polimerización por micro-emulsión inversa**

Mientras que la polimerización por mini-emulsión inversa forma macroemulsiones cinéticamente estables alrededor de CMC, la polimerización por micro-emulsión

inversa produce microemulsiones termodinámicamente estables a cantidades emulsificante mayores a CMC. Este proceso también involucra gotas acuosas, dispersas establemente con la ayuda de grandes cantidades de surfactantes no solubles en agua en un medio orgánico continuo. La polimerización ocurre dentro de las gotas acuosas, produciendo nanopartículas coloidales estables hidrofílicas y solubles en agua, con diámetros que oscilan entre 50-100 nm. Este método ha sido explorado para la preparación de nanopartículas bien definidas en base a PNIPAAm.

### **2.6.5 Polimerización por emulsión libre de detergente**

La polimerización por emulsión libre de detergente es una polimerización por emulsión sin la adición de un estabilizador coloidal. [Motokawa 2005].

Una desventaja de un sistema de polimerización por emulsión es la contaminación de la superficie con emulsificantes tales como surfactantes o polímeros anfifílicos, ya que es difícil la remoción de los emulsificantes. En cambio, el método de polimerización por emulsión libre de detergente es limpio ya que no se emplean emulsificantes.

A continuación se describe una propuesta de un mecanismo general de todas las polimerizaciones por emulsión. El mecanismo comienza con la deformación de la interface de la fase acuosa y el monómero en el campo de rompimiento, por lo cual se forma un área supersaturada de monómero relativa a la interface de la fase acuosa (Figura 2 a). Minigotas del monómero se forman en el área supersaturada debido a la condensación de las moléculas del monómero (Figura 2 b). La vida de estas minigotas del monómero que existen en la fase acuosa está determinada por la tensión superficial entre la minigotas y la fase acuosa. Obviamente, cuando la tensión superficial es alta, las minigotas regresarán a la fase del monómero tan rápido como se estén formando. (Figura 2 opción IV). En una polimerización por emulsión convencional, el emulsificante empleado favorece a la supervivencia de las minigotas. Las moléculas del

## Teoría general

---

emulsificante adsorbidas en la superficie de las minigotas no solamente bajarán drásticamente la tensión superficial sino también proveerán repulsión electrostática o impedimento estérico en contra de la destrucción de las minigotas. Cuando la concentración del emulsificante sea suficiente para prevenir que las micelas puedan colisionar e incorporarse, es entonces el momento en que la mini-emulsión puede formarse (Figura 2, d y e).

En un sistema de polimerización por emulsión libre de detergente, la estabilización de las minigotas del monómero depende de la adsorción de las moléculas de iniciador (incluyendo iones) o de la hidrofílicidad de los monómeros si son adicionados. Los efectos de estabilidad de estas especies pueden ser débiles. Pero, con la temperatura de polimerización la situación puede cambiar debido a que las reacciones en la fase acuosa y en la interface pueden proveer suficiente cantidad de emulsificante para la estabilización de las minigotas. La reacción en la interface puede ser la determinante para la formación de las partículas en muchos de los casos, ya que los oligómeros generados en la interface pueden actuar como un núcleo para la condensación de monómeros en el área supersaturada. (Figura 2, opciones V y VI). Así, la velocidad de generación de las partículas está relacionada con la velocidad de reacción en la interface, la cual está determinada por la concentración del iniciador en la interface. Debido a las características ya mencionadas de la interface y además de algunas reacciones en la fase acuosa, se provoca que la co-polimerización por emulsión sea más abundante en los componentes hidrofílicos. [Ni *et al.*, 2001]

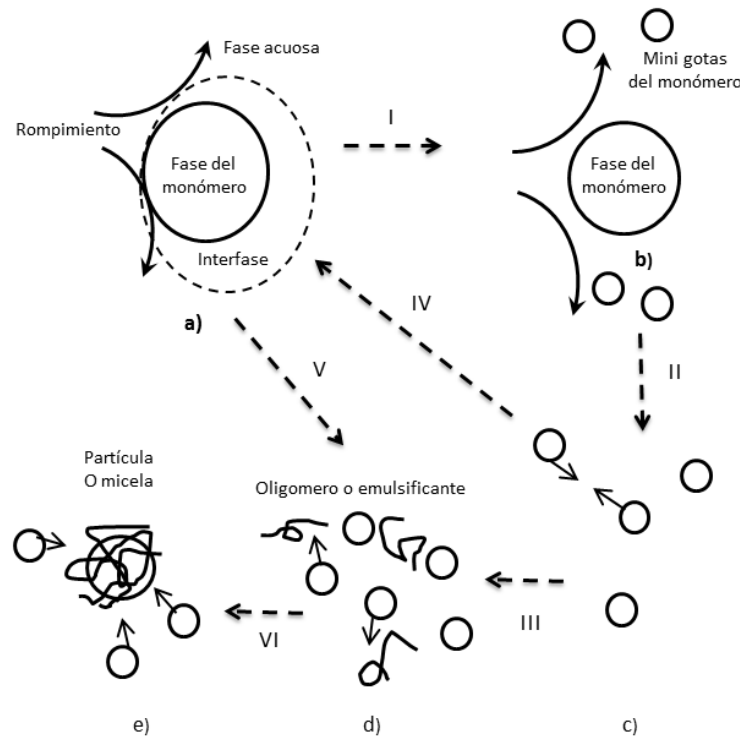


Figura 2. Mecanismo de formación interfacial de la partícula general por medio de todos los tipos de polimerización por emulsión. [Ni et al., 2001]

## 2.7 Fundamento de técnicas de análisis

### 2.7.1 Medición de tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica

El proceso de dispersión de luz dinámica también conocido como espectroscopía de correlación de fotón (DLS y PCS, por sus siglas en inglés), mide el movimiento Browniano y lo relaciona al tamaño de partícula. Esto lo hace iluminando las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada [Malvern Instruments, 2004]

Las partículas en un líquido están en constante movimiento debido al movimiento Browniano, el cual es la movilidad de las partículas debido a colisiones al azar con otras moléculas en el líquido. El aporte de esto para el DLS

## Teoría general

es que las partículas pequeñas se mueven más rápidamente que las partículas grandes. La relación entre el tamaño de partícula y su velocidad debido al movimiento Browniano es definida por la ecuación de Stokes-Einstein:

$d(H)$  = diámetro hidrodinámico

$D$  = coeficiente de difusión traslacional

$T$  = temperatura absoluta

$K$  = constante de Boltzmann

$\eta$  = viscosidad

$$d(H) = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

El diámetro hidrodinámico es el diámetro de la esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula. El coeficiente de difusión traslacional no depende solo del tamaño de la partícula (núcleo) sino también de cualquier estructura de la superficie, así como también de la concentración y tipo de iones en el medio.

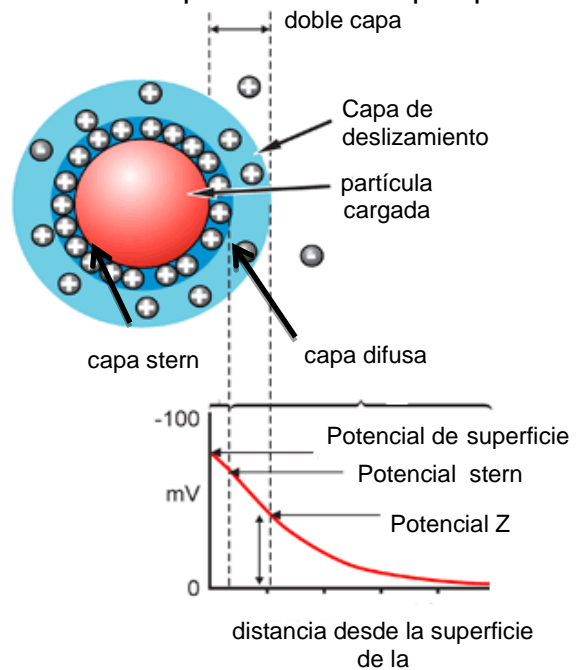
El instrumento de DLS cuenta con un correlacionador digital, el cual mide el grado de similitud entre dos señales en un periodo de tiempo. En donde dos señales de intensidad iguales tendrán una correlación de 1.0 y dos señales de intensidad completamente diferentes tendrán una correlación de 0.0. La correlación de una partícula grande cae más lentamente que la correlación de una partícula pequeña. El instrumento puede registrar una correlación de cero en un tiempo de 1.0 a 10.0 milésimas de segundo. Una vez que la función de correlación ha sido medida, esta información puede ser usada para calcular la distribución de tamaño de partícula. El software Zetasizer usa algoritmos para extraer el decaimiento de las velocidades para un número de grupo de tamaños y así producir una distribución de tamaños. El rango de medición de tamaño de partícula es de 0.6 nm a 6.0  $\mu\text{m}$ .

El parámetro del índice de polidispersidad (PDI) es adimensional, valores de PDI menores a 0.05 son raramente vistos en la práctica, aunque los estándares de látex si llegan a presentar estos valores. Los valores de PDI

mayores a 0.70 indican que la muestra tiene una distribución de tamaño muy amplia. [Chiriac *et al.*, 2011]

### 2.7.2 Medición del potencial Zeta por el Nano Zetasizer

Existe una capa eléctrica doble alrededor de cada partícula. La capa que está fuertemente unida alrededor de la partícula se llama capa Stern. La capa que se encuentra afuera o más alejada, en donde los iones están más débilmente unidos, se llama capa difusa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución. Cuando la partícula se mueve, los iones que están hacia adentro del límite de la capa difusa, se mueven junto con la partícula.



Los iones que están hacia afuera de este límite no se mueven junto con la partícula. A este límite se le llama el corte de la superficie hidrodinámico o plano de desplazamiento. El potencial que hay en este límite se le conoce como potencial Zeta.

El potencial zeta es la fuerza dispersora, en otras palabras es la medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas, partículas y células en un líquido. En los seres vivos evita por ejemplo la coagulación intravascular. La dispersión ocurre debido a la repulsión mutua de las cargas con la misma polaridad. En condiciones normales todos los componentes que ocupan el lumen de un vaso deben tener una carga eléctrica negativa [Riddick 1968]

Existe una relación destacable entre el potencial zeta y el potencial de superficie, relación que depende de la cantidad de iones presentes en la solución.

Así por ejemplo, en el caso del agua, la doble capa provoca que el potencial zeta tenga una aproximación aceptable del potencial de superficie.

Los equipos series nano zetasizer, calculan el potencial zeta determinando la movilidad electroforética y usando la ecuación de Henry. La movilidad electroforética se obtiene haciendo una electroforesis en la muestra y midiendo la velocidad de la partícula usando el velocímetro Laser Doppler (LDV) [Malvern Instruments, 2004]

### 2.7.3 AFM

El microscopio de fuerza atómica provee la imagen de una superficie sin que intervengan los efectos electrónicos, al medir las fuerzas mecánicas entre la punta detectora (<10.0 nm) y la superficie de la superficie a una corta distancia (0.2-10.0 nm). La punta detectora esta sostenida por una especie de resorte flexible, la punta toca gentilmente la superficie. [cibercita, f]

La fuerza puede ser descrita usando la ley de Hooke's:

$$F = -K - X$$

K = constante del resorte flexible aprox. 0.1-1.0 N/m

F = Fuerza (las fuerzas pueden variar de nN ( $10^{-9}$ ) a  $\mu$ N ( $10^{-6}$ ))

X = Deflexión del casi resorte flexible

### 2.7.4 TEM

En 1931 el primer microscopio electrónico fue construido por Knoll y Ruska. En microscopía electrónica de transmisión, los electrones son acelerados con un voltaje alto de entre (100-1000 kV) a una velocidad cercana a la velocidad de la luz (0.6-0.9 c); así que se deben considerar relativamente como partículas. La  $\lambda$  asociada es de unos 5 órdenes de magnitud más pequeña (0.04-0.008 Å) que la de la  $\lambda_{luz}$  (410-660 nm). Sin embargo la aberración de los lentes electromagnéticos limita el ángulo de convergencia del haz de electrones a  $0.5^\circ$  (en comparación de  $70^\circ$  de los lentes de vidrio usados en óptica), lo cual reduce la

resolución del TEM a la orden de Å, esta resolución permite determinar imágenes y estructura a niveles atómicos de la muestra.

### Criterio de Rayleigh

$\Delta X$  = distancia que separa a dos objetos

$\lambda$  = longitud de onda de la imagen de luz

$n$  = Índice de refracción del medio

$\alpha$  = ángulo máximo entre el haz incidente y deflectado.

$n \text{Sen} \alpha$  = número de apertura

$$\Delta X \geq 0.61 \frac{\lambda}{n \text{Sen} \alpha}$$

En condiciones normales un objeto será apenas visto independientemente de su composición química en una imagen de electrón si el producto del grosor (nm) por la densidad ( $\text{g/cm}^3$ ) es mayor a 10.0. Las muestras biológicas tienen una densidad alrededor de  $1.0 \text{ g/cm}^3$ , por lo que es difícil ver especies menores de 10.0 nm sin algún tratamiento de contraste. La densidad de la mayoría de los contrastes usados está entre  $3.8 - 5.7 \text{ g/cm}^3$ .

La imagen se forma cuando los electrones incidentes son dispersados por la muestra y enfocados por uno o más lentes electromagnéticas. La región densa o gruesa de la muestra aparece oscura debido a que gran parte de los electrones dispersados no alcanzan el plano de imagen. A este proceso se le llama contraste de amplitud; y en tinción negativa, los átomos pesados incrementan el contraste de amplitud en muestras biológicas.



### 3.1 Lista de reactivos y solventes

Ácido clorhídrico, 37.4%	(Fermont)
Bacitracina, sal de zinc (bacteria liqueniformis)	(Sigma)
Cianocobalamina (vitamina B12)	(E. K. C.)
Diclorometano, 99.9%	(Fermont)
Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AIBA), 97%	(Aldrich)
Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), 98%	(Aldrich)
3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro [5.5] undecano (DVA), 98%	(Aldrich)
N-isopropilacrilamida (NIPAAm), 98%	(TCI)
Isotiocianato de fluoresceína, 90%	(Sigma)
Metacrilato del 2,2'-(dietilamino) etilo, 99% (DMAEM)	(Aldrich)
N,N'-metilenebisacrilamida (MBA), 99%	(Aldrich)
Persulfato de amonio (APS), 98%	(Aldrich)
Persulfato de potasio (KPS), 99%	(Faga Lab)
Polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMA), Mw 1100 g/mol.	(Aldrich)
Polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMA), Mw 2080 g/mol.	(Aldrich)
Propionamida de 2,2'-azobis(2-metil-N-(2-hidroxietil),	(Wako)
Nitrógeno grado ultra alta pureza (UHP),	(INFRA)
Removedor del inhibidor hidroquinina,	(Aldrich)
Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO:3,500, diám. 10.0 mm	
Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO:15,000, diám. 10.0 mm	
Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO:12-14,000, diám. 29.0 mm	
Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO:50,000, diám. 29.0 mm	

### **3.2 Instrumentos de medición**

#### **3.2.1 Espectrofotómetros UV-Vis**

- 1). Beckman Coulter, DU520. Espectrofotómetro UV/Vis para uso general.
- 2). Thermo Scientific Genesys 20 espectrofotómetro. Modelo 4001/4

#### **3.2.2 Liofilizador**

Labcono, Equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5, Serie 030909557

#### **3.2.3 Potenciómetro**

Corning-Combo W/PT, contenido interior 3.0 M KCl. cat 476436

#### **3.2.4 Dispersor de Luz Dinámica. DLS**

Instrumento Zetasizer Nano-ZS, modelo ZEN3500 con láser verde de 532 nm.

#### **3.2.5 Fluorómetro**

Thermo Scientific Fluoroskan Ascent. FL 2.6. No. Serie: 374-3189C

Excitación 485, Emission 538, agitación 10s, velocidad 1200 rpm, cuenta con un soporte para una rejilla de 96 pocillos.

#### **3.2.6 Microscopio de fuerza atómica. AFM**

Agilent Technologies (molecular imaging) 5PM 5100, software WSxM develop 3.0

#### **3.2.7 Microscopio electrónico de transmisión. TEM**

JEOL JEM-2010, Voltaje de aceleración 200KV. Resolución aprox. 1.8-1.9 Å

#### **3.2.8 Espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)**

Fourier transforms infrared spectroscopy, Perkin Elmer, 1605 series FTIR

### 3.3 Purificación de reactivos

#### 3.3.1 Purificación de NIPAAm

Se disolvió 25.0 g de NIPAAm en unos 200.0 mL aprox. de hexano manteniendo una temperatura de 45°C sumergiéndolo en un baño de agua. Una vez disuelto, se retiró del baño, se ambientó a temperatura del cuarto y se colocó en un baño de hielo para precipitar. Posteriormente se filtró a vacío y se hicieron lavados con 200.0 mL de hexano frío. Se dejó evaporar el solvente para poder ser usado [Lee 2006]

#### 3.3.2 Purificación de DMAEM y EGDMA

Se corrió el monómero por una columna empacada con removedor del inhibidor de hidroquinona.

### 3.4 Procedimiento experimental

Para la realización de todos los experimentos se partió de un trabajo de investigación previo [Serrano-Medina *et al.*, 2012]. El primer parámetro que se adoptó fue hacer las reacciones a una concentración del 1.0% w/v, ya que se observó que con una concentración del 2.0% w/v se formaba un precipitado. El segundo parámetro que se consideró fue la relación de NIPAAm:PEGMA (70:30 w/w), ya que en la realización de las reacciones con PEGMA, se observó que a mayor contenido de PEGMA el tamaño de partícula disminuía, sin embargo un contenido mayor de 40.0% w/w resulta ser excesivo para estabilizar las nano/micropartículas de NIPAAm. Cabe mencionar que estos autores utilizaron 1.0% mol de EGDMA como entrecruzante en esos experimentos. El último parámetro que se estableció fue el de realizar las reacciones a una temperatura de 85°C.

### 3.4.1 Purificación de nano/microgeles

Una vez sintetizadas las nanopartículas, éstas se purificaron mediante diálisis; se cortó un tramo de unos 16.0 cm de largo de una membrana tubular MWCO: 12-14,000, se sumergió en agua destilada para hidratarla. Se cerró uno de los extremos con unas pinzas especiales para membranas, después en el otro extremo se vertió la muestra y se cerró el extremo con otra pinza. La membrana se sumergió en agua durante 5 días, renovando este solvente una vez por día.

### 3.4.2 Liofilización

Las muestras purificadas nano/microgeles, se congelaron en viales y se liofilizaron dentro del portamuestras del equipo (vasos de LABCONCO). Para muestras con poco volumen (<10.0 mL) se liofilizó durante un día y medio, y para muestras con volúmenes mayores durante 2.5 días.

### 3.4.3 Reconstitución

Los nano/microgeles liofilizados se reconstituyeron con el volumen necesario de agua destilada/desionizada, para obtener una concentración igual a la que se tenía cuando se realizó la reacción, aproximadamente 1.0% W/V.

### 3.4.4 Determinación del tamaño por DLS

#### a) Determinación de Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó de la siguiente manera: se tomó un 1.0 mL del producto de la reacción aforándose a 10.0 mL con agua destilada y filtrada, de esta dilución se transfirió una alícuota de 1.0 mL a una celda transparente la cual a su vez se colocó en la rejilla del instrumento. La muestra se analizó usando parámetros siguientes:

Medición: tamaño

Material: NIPAAm, IR: 1.42

Absorción: 0.01

Dispersante: agua, T.25°C

Viscosidad: 0.8871 cp

IR: 1.33

Temperatura: 25°C                      Tiempo de equilibrio: 240 s  
Celda: DTS0012 cubeta desechable  
Ángulo de detección: 173°            Duración de la medición: automático  
Número de mediciones: 3  
Atenuación: automático                Extensión de duración para partículas grandes: No  
Modo de análisis: Propósito general (resolución normal).

### b) Determinación de la variación del tamaño de partícula haciendo un barrido de temperatura

La variación del tamaño de partícula en función del cambio de temperatura se determinó de la siguiente manera: un 1.0 mL de la reacción se aforó a 10.0mL con agua desionizada/filtrada, de esta dilución se transfirió una alícuota de 1.0 mL al porta muestra del instrumento, y se analizó la muestra usando los parámetros siguientes:

Medición > Barrido > Temperatura > Tamaño

Material: NIPAAm, IR: 1.42, Absorción: 0.01

Dispersante: Agua, T. 18.0°C, Viscosidad: 0.8872 cp, IR: 1.330

Barrido:        Secuencia de barrido: 20.0-50.0°C, Intervalo cada 2.0°C,

✓ Regresar a la temperatura de inicio.

✓ determinar el punto de fusión

Tiempo de equilibrio: 240 s

Número de mediciones: 1

Duración de la corrida: 2:00

### **3.4.5 Determinación del potencial Z**

Un mililitro de la muestra se aforó a 10.0 mL, con esta dilución se llenó una celda de potencial zeta y se colocó en el equipo, y se analizó usando los parámetros siguientes:

Medición: Potencial Zeta

Material: NIPAAm, IR: 1.42      Absorción: 0.01  
Dispersante: agua, T. 25°C      Viscosidad: 0.8871 cp      IR: 1.33  
Temperatura: 25°C      Tiempo de equilibrio: 120 s  
Celda: DTS1060C, cubeta transparente desechable zeta  
Duración de la medición: automático      Numero de mediciones: 3  
Atenuación: automática      Voltaje: automático  
Modo de análisis: propósito general

### 3.4.6 Titulación ácido-base (método potenciométrico)

Se pesó aproximadamente 20.2 mg de una muestra liofilizada, y usando la siguiente relación: 100.0 mg de muestra diluida en 50.0 mL de KCl 0.5 M, se adicionó a esta muestra 6.29 mL de KCl 0.5 M, la solución resultante se dejó en agitación por no más de 30 min, ya que las muestras se disolvían fácilmente.

Dado que las soluciones de las muestras presentaban un pH cercano a 6.0, todas las muestras se llevaron a un pH=11.7 con KOH 0.0848 M para asegurar que los grupos básicos estuvieran neutros. Después, las muestras se titularon con HCl 0.1053 M hasta llegar a un pH cercano a 1.90. Posteriormente se hicieron los cálculos correspondientes para la determinación de grupos básicos, y en otros casos para la determinación de grupos ácidos.

### 3.4.7 Preparación de la muestra para microscopía AFM

Se diluyó 330.0  $\mu$ L de muestra en 10.0 mL de agua destilada y filtrada (para tener una concentración final de 0.4 mg/mL), esta dilución se ultrasonificó durante 20 minutos, se sometió a agitación por 2 horas más y se dejó reposar toda la noche, al día siguiente la muestra se filtró a través una membrana de 0.45  $\mu$ . Se eliminó el polvo de la mica antes de colocar la muestra. Se colocó una gota de la muestra sobre la mica y se dejó secar por 8 h (en un lugar libre de polvo). La muestra se encontraba lista para su análisis por AFM.

### **3.4.8 Preparación de la muestra para microscopía TEM**

Sobre una malla de cobre recubierta con carbón Lacey de 400 mesh, se colocó 2.0  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida en agua (0.4 mg/mL), se dejó secar por un minuto, sobre la muestra se añadió 2.0  $\mu\text{L}$  del colorante de contraste (ácido fosfotúngstico al 1.0%), se dejó secar y nuevamente se añadió 2.0  $\mu\text{L}$  del colorante, se permitió que la muestra se secase y se guardó en un lugar libre de polvo hasta su análisis por TEM.

### **3.5 Influencia de la carga del iniciador en la síntesis de nano/microgeles en la reacción de polimerización por emulsión libre de detergente.**

Se emplearon cuatro iniciadores, de los cuales dos son aniónicos (KPS, APS), uno catiónico (AIBA) y el otro es neutro (VA-086), y tres entrecruzantes (DVA, EGDMA Y MBA).

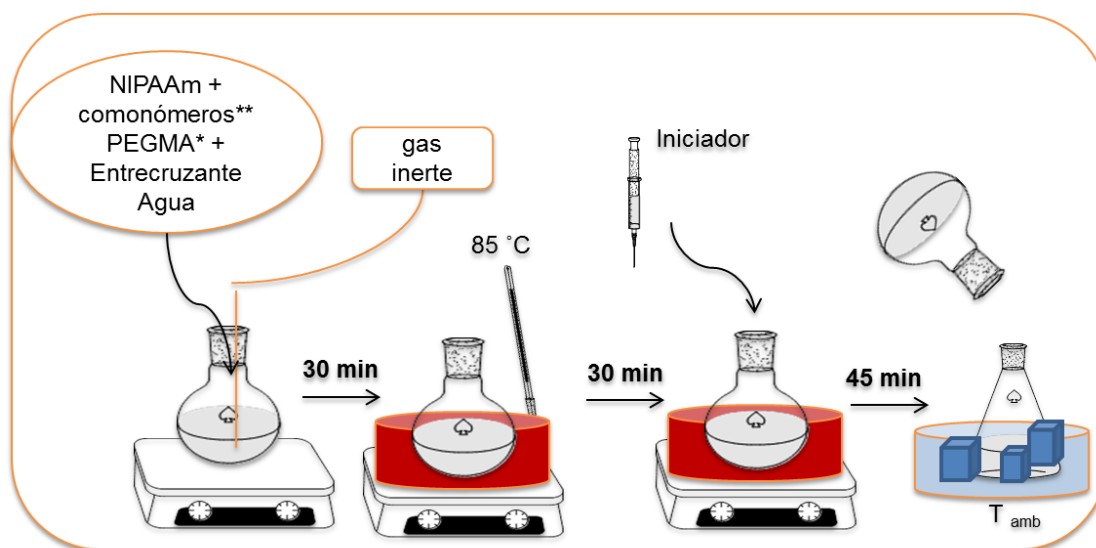
#### **3.5.1 Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente. (NIPAAm/PEGMA, entrecruzante, iniciador)**

La formulación utilizada fue la siguiente: NIPAAm/PEGMA (70:30 w/w), 1.0% (de los moles de la NIPAAm) de entrecruzante, y 2.0% (de los moles de la NIPAAm) de iniciador.

A continuación se describe el protocolo utilizado: en un matraz bola de 100.0 mL equipado con un agitador magnético se mezcló lo siguiente: 0.3521 g ( $3.11 \times 10^{-3}$  moles) de NIPAAm, 0.154 g ( $1.4 \times 10^{-4}$  moles) de PEGMA, y 7.1 mg ( $3.34 \times 10^{-5}$  moles) de DVA, en 50.0 mL de agua desionizada y filtrada. Se selló el matraz con un tapón septum, se le insertó una aguja larga para permitir la alimentación de gas nitrógeno y otra una aguja chica para eliminar el oxígeno. Después de 30 minutos se retiraron las agujas, se reforzó el sellado del matraz con parafilm (plástico parafinado) y se trasladó el matraz a un baño de aceite para

## Parte experimental

mantenerlo a una temperatura fija de 85°C (el equilibrio de temperaturas se alcanza en aproximadamente 30 min), a continuación se inyectó 0.28 mL de una solución de APS previamente preparada, tal cantidad contenía  $0.0165 \text{ g}$  ( $7.26 \times 10^{-5}$  moles) de APS; y así se inició la reacción de polimerización, en la Figura 3, podemos ver un diagrama general del proceso de la síntesis.



\*Se adiciona en la síntesis por polimerización por emulsión libre de detergente  
\*\*DMAEM, MA

Figura 3. Diagrama general de la síntesis de nano/microgeles por polimerización por dispersión y emulsión libre de detergente.

El progreso de las reacciones de polimerización se siguió mediante la determinación del porcentaje de transmitancia de alícuotas (a intervalos fijos de tiempo, se extrajo con una jeringa 1.0 mL de solución de reacción sin diluir y se determinó su % de T en un espectrofotómetro UV-Visible) de la mezcla de reacción conforme transcurre el tiempo. El tiempo final de reacción, es el tiempo transcurrido hasta que las lecturas de % de transmitancia dejan de variar y permanecen constantes.

### **3.6 Estudio del efecto del entrecruzante en el tamaño de partícula mediante la reacción de polimerización por dispersión.**

#### **3.6.1 Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por dispersión. (NIPAAm, entrecruzante, iniciador)**

La formulación que se estudió fue la siguiente:  $4.44 \times 10^{-3}$  moles de NIPAAm, del entrecruzante se tomó lo equivalente a 5.0% de moles de la NIPAAm y del iniciador se inyectó lo equivalente a 2.0% de moles de NIPAAm.

Se hace una descripción breve del protocolo: se colocó el monómero de NIPAAm (0.5032 g,  $4.44 \times 10^{-3}$  moles), y el entrecruzante EGDMA (0.043 g,  $2.17 \times 10^{-4}$  moles) en un matraz bola de 100.0 mL, se disolvieron en 50.0 mL de agua desionizada y filtrada. Se mantuvo bajo agitación, en atmósfera inerte de  $N_2$  por 30 minutos. Transcurrido el tiempo el matraz se transfirió a un baño de aceite con una temperatura de  $85^\circ\text{C}$ , se dejó equilibrar la temperatura por unos 30 minutos, después de este tiempo se adicionó el iniciador APS (0.02 g,  $8.76 \times 10^{-5}$  moles). A partir de este momento se empezó a monitorear la reacción. (Figura 3)

Se mantuvo el matraz bola alimentado con  $N_2$ , sellado con un tapón septum, y equipado con una aguja de escape, la aguja de la jeringa se lavó cada vez que se tomó una alícuota de la muestra a diferentes tiempos durante la reacción. Las alícuotas de la muestra se tomaron a los siguientes intervalos de tiempo: 2, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 minutos. Se succionó 1.5 mL de muestra cada vez, e inmediatamente un 1.0 mL de ésta se aforó a 10.0 mL con agua desionizada y filtrada.

Las modificaciones que se hicieron fueron las siguientes, 1) se varió el entrecruzante (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0%; EGDMA, DVA y MBA, respectivamente) manteniendo el iniciador (APS) al 2.0% de moles de NIPAAm. 2) se varió el porcentaje del iniciador a 4.0%, manteniendo la misma variación en los entrecruzantes.

Las muestras se leyeron en el espectrómetro visible a una  $\lambda = 542$  nm a fin de obtener el % de transmitancia, el cual varía conforme aumenta turbidez por el avance de la reacción. Al finalizar la reacción se determinó el tamaño hidrodinámico de los nano/microgeles mediante DLS.

A las muestras purificadas (punto 3.4.1) se les determinó lo siguiente: la estabilidad de las partículas en solución, tamaño, PDI, el efecto de la temperatura y pH en el diámetro hidrodinámico de las partículas vía DLS. En algunas muestras se determinó la carga superficial. La morfología y tamaño de las partículas se caracterizó por microscopía (AFM)

### **3.7 Estudio de la incorporación de DMAEM en los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA.**

#### **3.7.1 Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente. (NIPAAm/PEGMA (70:30 w/w); entrecruzante, iniciador, DMAEM)**

Se mezcló 0.3513 g ( $3.10 \times 10^{-3}$  moles) de NIPAAm, 0.1516 g ( $1.38 \times 10^{-4}$  moles) de PEGMA, 0.024 g ( $1.53 \times 10^{-4}$  moles) de DMAEM y 0.0161 g ( $7.58 \times 10^{-5}$  moles) de DVA, en un en un matraz bola de 100.0 mL, y se disolvieron con 50.0 mL de agua desionizada y filtrada, se dejó en agitación en atmósfera inerte por 30 min. Transcurrido el tiempo se selló bien el tapón septum con parafina y se transfirió el matraz a un baño de aceite con una temperatura de  $85^{\circ}\text{C}$ , ahí se dejó por 30 minutos para equilibrar la temperatura de la muestra, después de ese tiempo se adicionó 0.014 g ( $6.13 \times 10^{-5}$  moles) del iniciador APS, y a partir de este momento se dejaron transcurrir 45 minutos (Figura 3). Al finalizar el tiempo, el matraz con la mezcla de reacción se transfirió a un baño de hielo y se prosiguió con la purificación (punto 3.4.1)

Las modificaciones que se hicieron para esta serie de reacciones fueron las siguientes: primero se varió el peso molecular del PEGMA, utilizándose uno

con peso molecular de 1100 g/mol y otro de 2080 g/mol. Luego se varió el contenido de entrecruzante a 2.5% y 5.0% de moles de NIPAAm. También se modificó el iniciador usando APS y AIBA; por último se varió el contenido de DMAEM.

A las muestras purificadas, se les determinó lo siguiente: la estabilidad de las partículas en solución, tamaño, PDI, el efecto de la temperatura y pH en el diámetro hidrodinámico de las partículas vía DLS. En algunas muestras se determinó la carga superficial. Se caracterizó la morfología y tamaño de las partículas por microscopía (TEM). Y se llevó a cabo las titulaciones ácido-base para determinar el contenido de base presente.

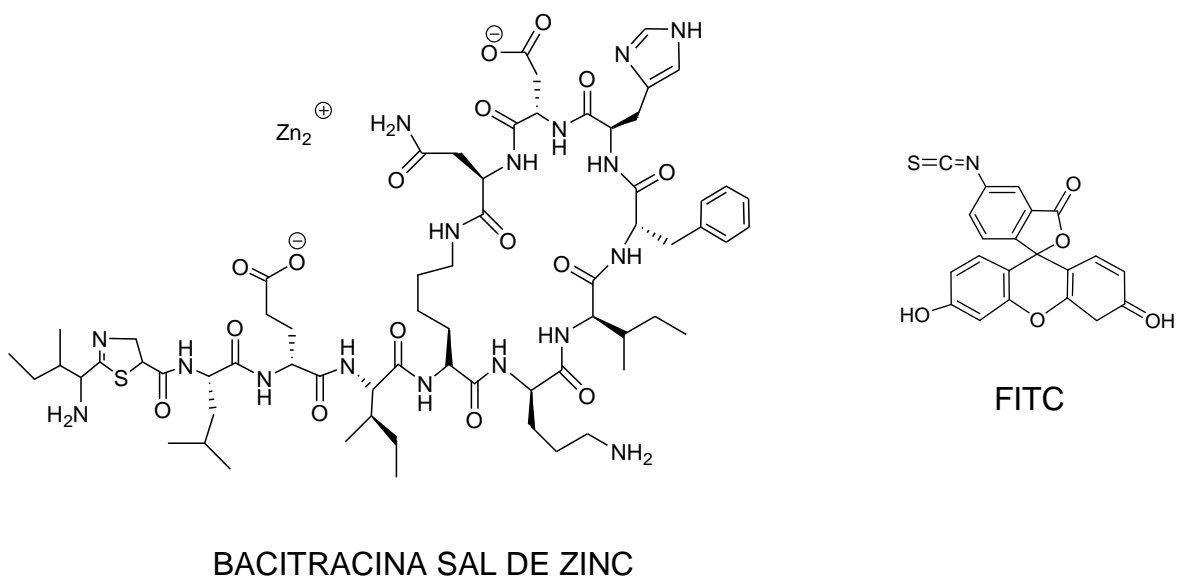
### **3.7.2 Síntesis de nano/microgeles mediante la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente. (NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub> (70:30 w/w); DVA, iniciador, MA)**

Para contar con una referencia se realizó la síntesis con un monómero ácido (MA) en vez de DMAEM, en donde se varió el iniciador (AIBA y APS). En esta síntesis se ajustó el pH de la solución una vez que se añadió el MA y antes de incorporar el DVA, ya que este entrecruzante comienza a degradarse una vez que el pH alcanza un valor de 5.0 o inferior.

Se mezcló 0.3533 g (3.12 mmoles de NIPAAm), 0.1607 g (0.077 mmoles) de PEGMA<sub>2080</sub>, y 10.0% (en base a moles de NIPAAm) 0.305 mmoles de MA; en este punto la solución presentó un pH=3.38, se adicionó lentamente 3.0 mL de NaOH 0.1 N para subir el pH (hasta alrededor de 7.41), el volumen añadido NaOH 0.1 N se restó de los 50.0 mL de agua destinados originalmente para realizar la reacción. Después de esta neutralización se agregó 0.0166 g (0.078 mmoles) del entrecruzante DVA. Posteriormente se procedió como en las síntesis anteriores, para llevar a cabo la polimerización, se inyectó el iniciador: 0.0169 g (0.062 mmoles) de AIBA y la reacción se llevó a cabo durante 45 minutos (Figura 3). La purificación se llevó a cabo de la misma manera que en las síntesis anteriores.

### 3.7.3 Marcado de la bacitracina con el isotiocianato de fluoresceína (isómero I)

Se prepararon dos soluciones, una de FITC, para la cual se mezcló 4.0 mg de FITC en 0.8 mL DMSO; y otra en donde se mezcló 40.0 mg de bacitracina (sal de Zn) en 3.0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5 M. Ambas soluciones se mezclaron y se aforaron a un volumen final de 15.0 mL con agua destilada y filtrada. El vial se protegió de la luz con papel aluminio, y se mantuvo a una temperatura de 4°C por 8 h. Después de ese tiempo, la reacción se detuvo agregando 5.0 mL de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 200.0 mM, y se mantuvo por 2 h más a temperatura de refrigeración.



Una vez terminada la reacción la muestra se pre-centrifugó colocando aproximadamente 1.6 mL en un tubo eppendorf de 2.0 mL por 5 minutos a 14.5 rpm. La solución centrifugada anterior se transfirió a un dispositivo de ultrafiltración de 3.0 KDa montado sobre un tubo cónico de 15.0 mL, se centrifugó por 30 min cada vez, a 5000 rpm y 20°C; el proceso anterior se repitió hasta obtener una columna de solución en el filtro de aproximadamente 5.0 mm. Se prosiguió con cuatro lavados de agua. Dejándose finalmente una columna de

hasta 5.0 mm después del filtro interno. El ultrafiltrado anterior se transfirió en su totalidad a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se congeló y posteriormente se liofilizó. Se utilizó cromatografía en capa fina como método de identificación. (Anexo 7.8)

### **3.7.4 Cargado de los nanogeles con vitamina B12**

Se diluyó 8.3 mg de vitamina B12 en 1.0 mL de solución amortiguadora a pH 7.4, posteriormente se mezcló con una solución de nanogel (41.5 mg de nanogel seco en 2.0 mL de solución amortiguadora a pH 7.4). Se guardó la mezcla a una temperatura de 4°C por 4 días.

Una vez transcurrido el tiempo, se colocó la mezcla en una membrana de diálisis de 3,500 MWCO, y se sumergió en 80.0 mL de una solución amortiguadora a pH 7.4, cambiando la solución cada hora por cuatro horas. Una vez terminado el proceso, se transfirió la solución a un vial previamente tarado, para ser liofilizado y se continuó con los estudios de liberación.

### **3.7.5 Determinación del cargado de los nanogeles con vitamina B12**

Se realizó una curva estándar partiendo de una solución madre de concentración 1.0 mg/mL de vitamina B12 en una solución de (DMA:Agua, 1:1); la gráfica se puede ver en el Anexo 7.12. Posteriormente se preparó una solución madre de nanogeles cargados en (DMA:Agua 1:1) a una concentración de 1.0 mg/mL (dejándose en agitación por 5 hrs.), una vez disuelta se hizo una dilución (1:12.5) la cual se leyó por UV a una longitud de 361 nm, se hicieron los cálculos correspondientes al % de carga y eficiencia, usando las formulas del Anexo 7.13.

### **3.7.6 Estudio de liberación de los nanogeles cargados con vitamina B12**

Se pesó 4.7 mg de nanopartículas cargadas y se disolvió en 10.0 mL de una solución amortiguadora a pH 7.4, y a pH 5.0 respectivamente, una vez disuelto se introdujo la solución en una membrana de 12-14,000 MWCO, posteriormente se sumergió en 100.0 mL de una solución amortiguadora a pH de 7.4 y pH 5.0. Estas

## Parte experimental

---

liberaciones se realizaron a dos temperaturas a 37 y a 42°C. Una vez que se sumergió la membrana al medio, se empezó a tomar el tiempo de liberación, se tomó una alícuota de 1.0 mL en intervalos de tiempos, se reemplazó el mismo volumen del medio con nueva solución amortiguadora al mismo pH. Las muestras obtenidas se leyeron por UV a una longitud de 361 nm. Después se obtuvieron las concentraciones de las alícuotas por medio de las gráficas estándares correspondientes (Anexo 7.10 y 11).



### 4.1 Influencia de la carga del iniciador en la síntesis de nano/microgeles en la reacción de polimerización por emulsión libre de detergente.

En la parte experimental ya se mencionó las condiciones de la síntesis y las variaciones que se hicieron, en la Tabla 2, se muestra un resumen de los tiempos totales de reacción de cada síntesis. Los tiempos óptimos de reacción se determinaron graficando el porcentaje de transmitancia contra el tiempo, y una vez que ya no se apreciaba algún cambio significativo en la turbidez, se detuvo la reacción. En el caso del AIBA, la reacción se dejó proceder por mucho más tiempo para asegurarse que no disminuiría conforme al tiempo. Todas las reacciones partían de una solución clara y esta se iba tornando turbia o azul tenue conforme avanzaba la polimerización.

Tabla 2. Tiempo total de reacción de síntesis de nano/microgeles por medio de la polimerización por emulsión libre de detergente, con todas las combinaciones de iniciadores y entrecruzantes.

Iniciador térmico por radicales libres	DVA h' min''	EGDMA h' min''	MBA h' min''
KPS	2' 40''	3' 20''	2' 15''
APS	1' 20''	2' 15''	3' 30''
AIBA	8' 30''	20' 40''	1' 15''
VA-086	pp ~ 30''	pp ~ 40''	pp ~ 40''

(pp) precipitado

Con las gráficas de transmitancia podemos tener una idea de la velocidad de crecimiento de la partícula conforme avanza el tiempo de la reacción, así cuando ya no se ve un decremento del % de transmitancia se puede decir que el tamaño de partícula se ha estabilizado. Esto se puede ver claramente en las reacciones con VA-086, las cuales forman precipitados y se pudo corroborar visualmente (Figura 4 y 5).

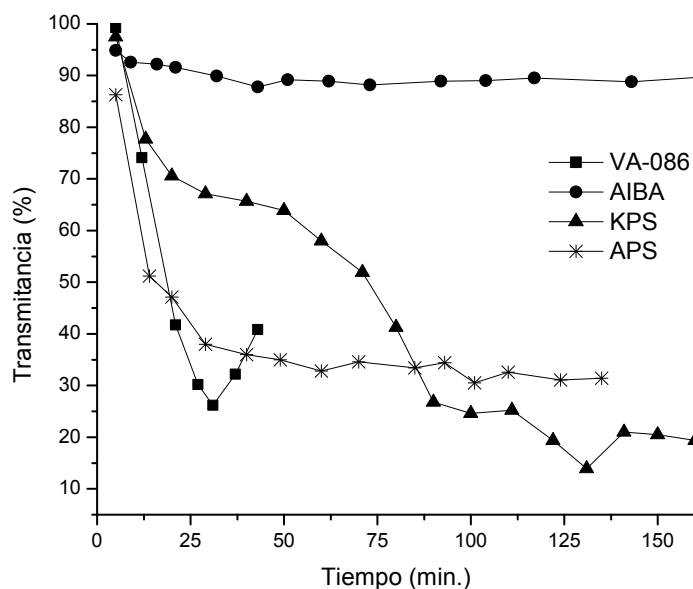


Figura 4. Medición del % de transmitancia ( $\lambda=600$  nm) con respecto al tiempo de reacción NIPAAm/PEGMA, EGDMA 1.0% e iniciador al 2.0%.

Todas las reacciones que se hicieron con 2.0% de iniciador VA-086 y con los 3 entrecruzantes precipitaron entre 30 y 40 minutos. Se hicieron otras reacciones con VA-086 en donde se varió la concentración de este iniciador a 4.0% y 1.0% usando el entrecruzante EGDMA, pero aun así el de 4.0% precipitó a los 10 minutos y el de 1.0% no precipitó pero se formó un gel blanco opaco alrededor del agitador magnético, el cual se disolvió al enfriarse la reacción.

Las partículas con entrecruzante MBA fueron más heterogéneas y con mayor PDI en comparación con las que contenían EGDMA y DVA, esto se puede observar en la Tabla 3; no se optimizó la formulación, ya que esto no se había planteado como objetivo en esta parte. Las muestras se almacenaron (aproximadamente 6 meses) para determinar su tamaño posteriormente.

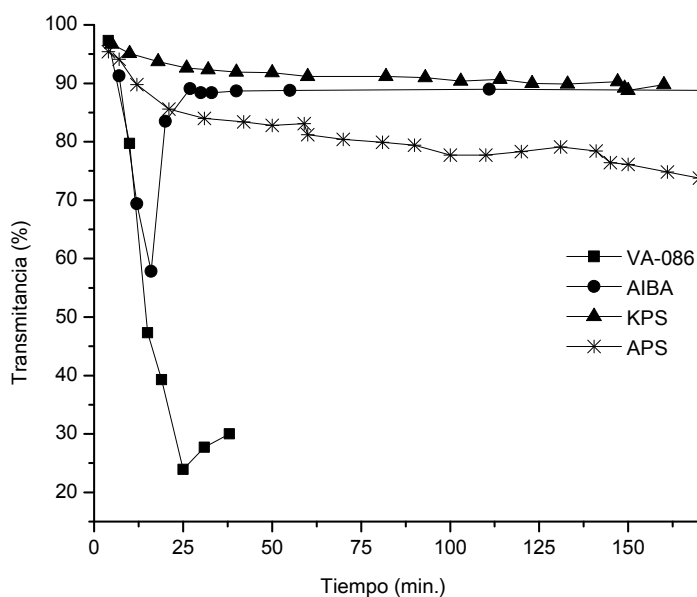


Figura 5. Medición del % de transmitancia ( $\lambda=600$  nm) con respecto al tiempo de reacción NIPAAm/PEGMA, DVA 1.0% e iniciador al 2.0%.

Tabla 3. Diámetros hidrodinámicos medidos por intensidad por DLS a 25°C, con su correspondiente valor de PDI, tomada en el tiempo final de reacción, las cuales son diferentes para cada muestra.

Iniciador térmico por radicales libres	DVA $D_h(\text{nm})/\text{PDI}$	EGDMA $D_h(\text{nm})/\text{PDI}$	MBA $D_h(\text{nm})/\text{PDI}$
KPS	139/0.211	403/0.248	217 <sup>a</sup> /0.574
APS	98 <sup>a</sup> /0.281	<sup>b</sup>	87 <sup>a</sup> /0.495
AIBA	139/0.211	403/0.248	217 <sup>a</sup> /0.574

<sup>a</sup> son muestras con más de una distribución de tamaños

<sup>b</sup> muestra insuficiente ya que el muestreo en esta reacción fue mayor

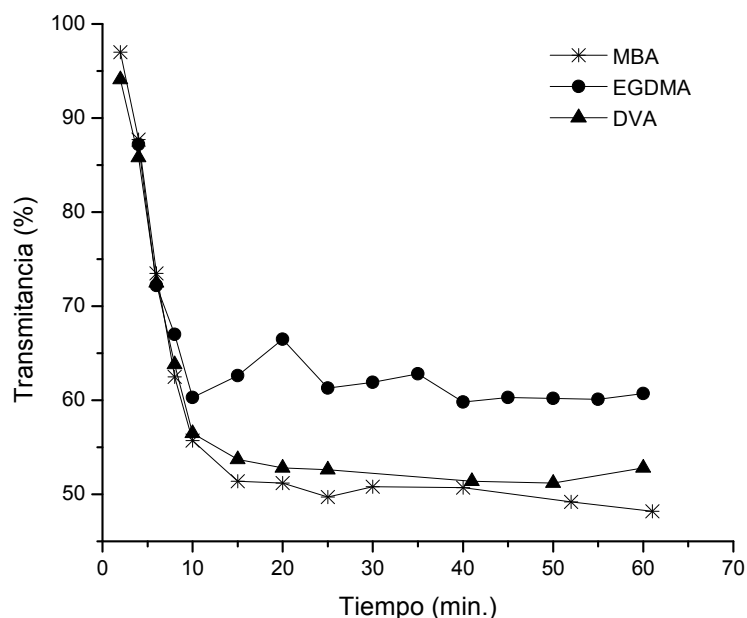


Figura 6. Medición del % de transmitancia ( $\lambda=400$  nm) con respecto al tiempo de reacción NIPAAm/PEGMA, AIBA 2.0% y entrecruzante al 1.0%.

Los resultados expresados en la Tabla 3, se tomaron al final de la reacción, ya que no fue posible seguirlos por DLS al momento de las reacciones. Se puede ver que solo con DVA y los tres iniciadores (AIBA, APS y KPS) se obtuvo partículas con una sola distribución de tamaños y su PDI correspondiente es menor a 0.2, lo que nos indica una buena homogeneidad de tamaños.

La Figura 6 muestra una serie de reacciones con el iniciador AIBA y con cada entrecruzante, ya que en los resultados preliminares (Tabla 3) estas partículas tenían diámetros hidrodinámicos más pequeños; a continuación se dan los diámetros hidrodinámicos por intensidad y su correspondiente PDI [ $D_h$  (nm), (PDI)]: MBA [155 nm (0.459)], EGDMA [166 nm (0.299)] y DVA [112 nm (0.134)]. Con esto se puede corroborar que con MBA se obtienen microgeles más heterogéneos en su tamaño, y con DVA hay menor dispersión de tamaños entre las partículas formadas.

Como ya se mencionó anteriormente en el punto 2.6.5 la estabilización de las minigotas de monómero durante la reacción, depende de la adsorción de las moléculas del iniciador (incluyendo iones) o de la hidrofílicidad. El PEGMA actúa como un estabilizante, también parece que los iniciadores se van hacia la superficie de la partícula en donde la carga que contienen provee cierta repulsión electrostática y así hay mayor estabilidad de las partículas en solución. Por lo tanto se cree que el iniciador VA-086 que no tiene carga, no ayuda a la estabilización de las partículas, al contrario de lo que ocurre con los otros iniciadores.

### **4.2 Estudio del efecto del entrecruzante en el tamaño de partícula mediante la reacción de polimerización por dispersión.**

De acuerdo a los resultados de las 3 series de polimerizaciones en donde se varió el contenido de APS de 2.0 a 4.0%, y contenido de entrecruzante del 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0%, (Anexo 7.1), se escogió trabajar con APS 4.0% y con entrecruzante al 5.0%. Experimentos previos en nuestro laboratorio indican que las partículas con 5.0% de entrecruzante resisten mejor el proceso de liofilización.

#### **4.2.1 Determinación del tamaño de las partículas a una temperatura fija de medición.**

En la Figura 7a, se observa la distribución de tamaños de los microgeles, que se midió por intensidad a 25°C, preparados con tres entrecruzantes diferentes (5.0% mol de entrecruzante en base a mol de NIPAAm). Las tres muestras presentaron una distribución monomodal. El diámetro hidrodinámico por intensidad presentó el siguiente orden: MBA (708 nm) > EGDMA (452 nm) > DVA (366 nm). Los índices de polidispersidad de los microgeles fueron 0.169, 0.167 y 0.139 para los entrecruzantes MBA, EGDMA y DVA respectivamente, lo cual sugirió distribuciones moderadamente homogéneas.

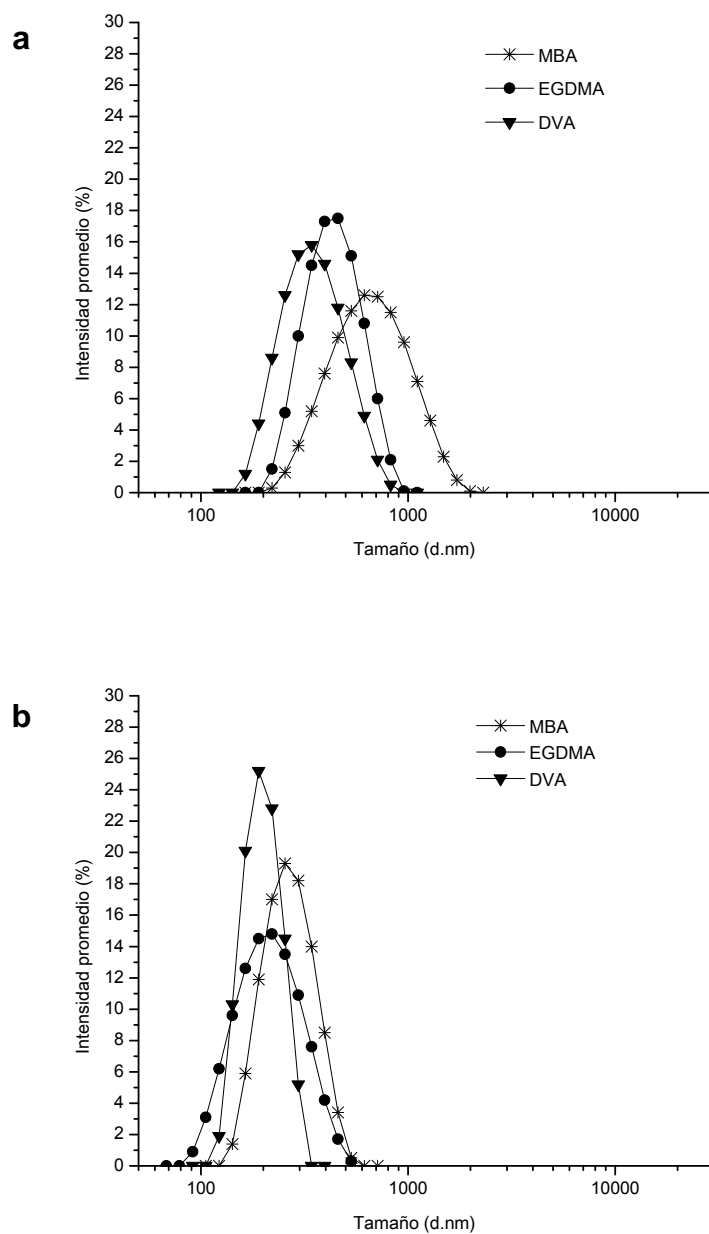


Figura 7. Distribución del tamaño de microgeles preparados con tres diferentes entrecruzantes (5.0% mol de entrecruzante y 4.0% mol de APS) **a** 25 °C, **b** 50°C.

A 50°C, arriba de la temperatura crítica baja de solución (LCST), los microgeles con entrecruzante MBA también tuvieron una distribución de tamaño más grande: 274 nm (PDI=0.062), mientras que para los microgeles con EGDMA fue de 225 nm (PDI=0.156), y para los de entrecruzante DVA fue de 200 nm (PDI=0.01) como se muestra en la Figura 7b.

### 4.2.2 Determinación de velocidad de reacción por medición de la transmitancia (turbidez)

Para explicar la diferencia observada en la distribución de tamaños obtenida con cada entrecruzante usado, se hicieron mediciones de transmitancia de las muestras a tiempos diferentes durante la reacción. Se realizó dos series de reacciones con una formulación general: (4.42 mmol de NIPAAm, 0.22 mmol de entrecruzante y 0.088 mmol APS), en cada serie se empleó a los tres entrecruzantes (DVA, MBA y/o EGDMA); en una serie solo se duplicó la cantidad de iniciador del 2.0 al 4.0% mol de APS.

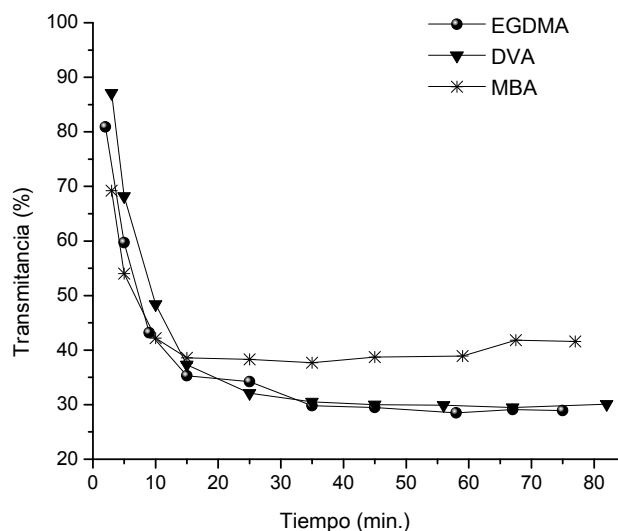


Figura 8. Medición del % de transmitancia con respecto al tiempo de micropartículas de NIPAAm dispersas, preparadas con tres diferentes entrecruzantes (5.0% mol de entrecruzante y 2.0% mol de APS)

## Resultados y discusión

Como se puede apreciar en la Figura 8, aproximadamente a los 15 minutos de haber iniciado la polimerización la transmitancia de la muestra con MBA ya no disminuyó, a diferencia de las muestras con EGDMA y DVA en donde ya no decreció a partir de los 35 minutos.

En los resultados mostrados en la Figura 9, se aumentó a 0.176 mmol de iniciador y se observó que la muestra con MBA y EGDMA no sufrían cambios después de los 10 minutos y con DVA no hubo cambios a partir de los 25 minutos. Lo cual sugiere que la polimerización con DVA fue más lenta en ambos casos; en cambio con EGDMA fue más lenta usando 2.0% de APS que con 4.0%. Se puede decir que la polimerización con MBA fue más rápida en ambos casos, ya que el % de transmitancia se estabilizó más rápidamente. Con base a lo anterior, se decidió que 45 minutos es el tiempo suficiente para la síntesis de nanogeles.

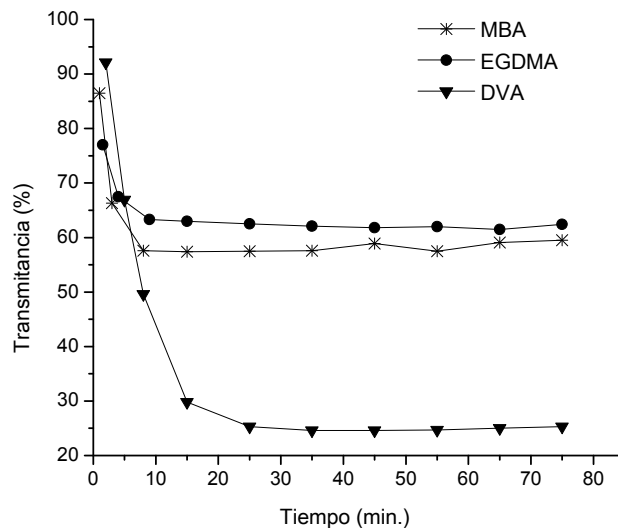


Figura 9. Medición del % de transmitancia con respecto al tiempo, micropartículas de NIPAAm dispersas, preparadas con tres diferentes entrecruzantes. (5.0% mol de entrecruzante y 4.0% mol de APS)

En los dos casos se apreció una precipitación al usar EGDMA. Se pudo concluir que usando 2.0% de APS la polimerización fue más lenta en general. La velocidad de polimerización puede ser explicada por el mecanismo de polimerización de heterofase. El monómero y el iniciador son solubles en el medio de polimerización, pero el medio es un solvente pobre para el polímero resultante. La mezcla de reacción fue homogénea al principio y la polimerización se inició en una solución homogénea, pero una separación de fases ocurrió a etapas tempranas de la polimerización, esto llevó a una nucleación y formación de partículas primarias, por consiguiente las partículas formadas se hincharon por el medio de polimerización, como resultado, la polimerización procedió mayormente dentro de las partículas individuales en donde cadenas radicáticas solas estuvieron separadas de otras. Además, la polimerización al parecer fué más rápida que en el sistema homogéneo. También podemos observar en las Figuras 8 y 9 que el DVA tiene un % de transmitancia menor, lo que nos indicó que las micropartículas están más colapsadas. La transmitancia de la mezcla de reacción fue prácticamente 100.0% a 542 nm para los tres entrecruzantes estudiados, así que el cambio de la transmitancia con respecto al tiempo no pudo ser atribuido a las propiedades ópticas de los monómeros. A estas muestras también se les midió el diámetro hidrodinámico por intensidad en el Anexo 7.2 se encuentran las gráficas.

### **4.2.3 Determinación del tamaño de las partículas respecto al tiempo de polimerización**

En la Figura 10, muestra la cinética del tamaño de partícula. Los microgeles entrecruzados con MBA mostraron un incremento rápido en el tamaño y después el tamaño decreció ligeramente al alcanzar un valor final. Resultados similares se observaron en el caso de los microgeles entrecruzados con EGDMA. El tiempo para alcanzar el tamaño máximo concuerda con el tiempo para alcanzar el mínimo en el valor de transmitancia como se muestra en la Figura 9. Por otro

lado, los microgeles entrecruzados con DVA mostraron un incremento en el tamaño conforme el tiempo de reacción transcurría hasta que alcanzaron un tamaño máximo. Se hipotetizó que el entrecruzante MBA se comportó como un entrecruzante hidrofílico (soluble en agua: 19.4 mM), así que cuando se estaba formando el núcleo del microgel se hincha en una cantidad considerable de una solución acuosa del monómero. Los monómeros absorbidos se polimerizaron rápidamente adentro del núcleo resultando en micropartículas con tamaño grande. Cuando una gelación completa ocurre, la entropía elástica lleva al microgel entrecruzado a su tamaño de equilibrio. Un efecto similar se observó durante la síntesis de microgeles entrecruzados con EGDMA, en este caso, el efecto hidrofílico es menos pronunciado (solubilidad en agua: 9.1 mM), resultando en una incorporación menor de monómeros solubles en agua, produciendo microgeles de tamaño menor. Por otro lado, los microgeles entrecruzados con DVA no mostraron este comportamiento en el tamaño pero si un incremento continuo en el tamaño. Esto puede ser explicado considerando la baja solubilidad del DVA (solubilidad en agua 4.3 mM) así que cuando las partículas primarias se forman por la fase de separación de los microradicales formados, no están completamente hinchados. Por lo cual, no ocurre una reacción rápida por la compartimentalización de los monómeros al interior de los microgeles, al contrario las semillas formadas crecen debido a la incorporación de los monómeros de la solución, hasta que la reacción se detiene. El resultado fue un microgel de DVA con tamaño más pequeño en comparación con los otros entrecruzantes.

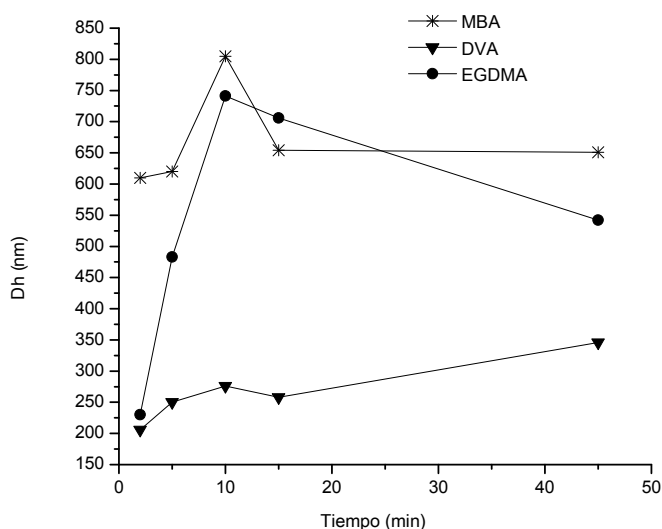


Figura 10. Tamaño del diámetro hidrodinámico por intensidad de las partículas al finalizar la reacción a diferentes tiempos.

#### 4.2.4 Determinación de la conversión respecto al tiempo de polimerización

La Figura 11, muestra la conversión de la reacción contra el tiempo, la cual concuerda con la conversión comparada con la cinética de cambio en tamaño. Se observó que la conversión de las micropartículas entrecruzadas con MBA, se incrementó rápidamente con el tiempo, debido a la incorporación de monómeros dentro del microgel antes del término del proceso de entrecruzamiento. Por otro lado, el entrecruzamiento con DVA mostró un lento pero estable incremento en la conversión de acuerdo con la cinética del incremento en tamaño. Los resultados fueron muy similares a lo reportado en la producción de un microgel por polimerización por emulsión del metacrilato de 2-hidroxietil (HEMA), un material hidrofílico [Chiriac *et al.*, 2011]. Cuando no hay entrecruzante o se usa 5.0% mol de DVA en la formulación se incrementa rápidamente el tamaño del microgel a unos cuantos minutos de haber empezado la reacción. Después de la etapa de iniciación, el tamaño de los microgeles decreció conforme el tiempo avanzó hasta que se alcanzó el equilibrio. Por tanto, cuando el entrecruzante está a 10.0% mol

de DVA, las partículas muestran un ligero aumento en el tamaño con respecto al tiempo, hasta que se alcanza el tamaño final, el cual es más pequeño que con la otra composición estudiada. Los autores consideran que esto indica que a 10.0% mol de DVA éste imparte hidrofobicidad a las micropartículas de PHEMA haciéndolos menos hinchables durante la formación del microgel.

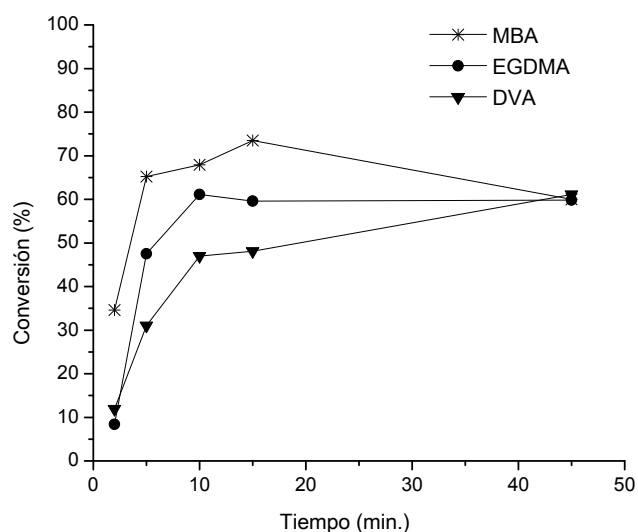


Figura 11. Evolución de la conversión durante el proceso de polimerización por dispersión.

### 4.2.5 Determinación del efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles de NIPAAm preparados con diferentes entrecruzantes

En este estudio, se prepararon microgeles de PNIPAAm con diferentes proporciones de entrecruzantes (1.0 al 5.0% mol de entrecruzante). Los microgeles se formaron usando 2.0 al 5.0% mol de entrecruzante DVA, 3.0 al 5.0% de mol de entrecruzante EGDMA, pero solamente usando del 4.0 al 5.0% de entrecruzante MBA. El tamaño de los microgeles resultantes a diferentes temperaturas y la razón de hinchamiento fueron estimados por DLS. La Figura 12, muestra el efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles. Todos los

## Resultados y discusión

microgeles preparados muestran una temperatura crítica de transición de fase evaluada por el punto de inflexión de las curvas. En la Tabla 4, se muestra la  $T_c$  para los diferentes microgeles sintetizados.

Tabla 4.  $T_c$ ,  $D_h$  por intensidad a 25 y 50°C, y la razón de hinchamiento ( $D_{h,25\text{ °C}}/D_{h,50\text{ °C}}$ ) de los diferentes microgeles sintetizados.

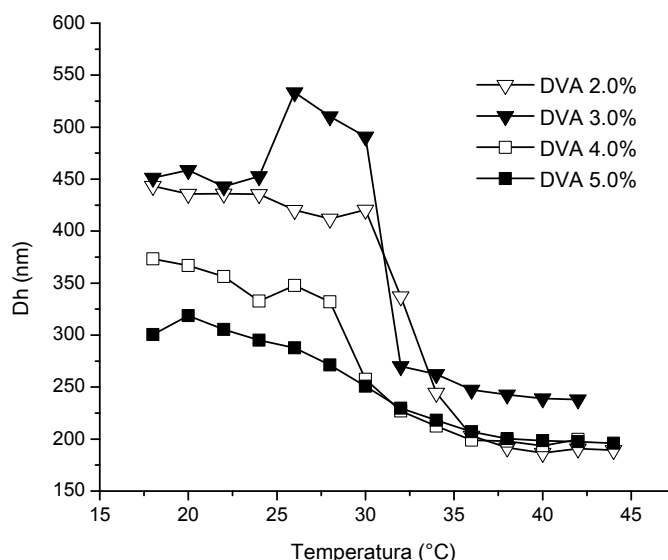
Entrecruzante (%mol)	$T_c$	$D_h$ nm a 25 °C (PDI)	$D_h$ nm a 50 °C (PDI)	$D_{h,25\text{ °C}}/D_{h,50\text{ °C}}$
DVA 5.0 %	30	351 (0.144)	200 (0.01)	1.75
DVA 4.0 %	30	359 (0.217)	197 (0.002)	1.82
DVA 3.0 %	30	460 (0.002)	332 (0.154)	1.38
DVA 2.0 %	32	465 (0.102)	199 (0.003)	2.34
MBA 5.0 %	34	630 (0.058)	274 (0.062)	2.30
MBA 4.0 %	34	727 (0.219)	354 (0.229)	2.05
EGDMA 5.0 %	32	410 (0.065)	225 (0.156)	1.82
EGDMA 4.0 %	32	510 (0.123)	293* (0.273)	1.74
EGDMA 3.0 %	32	578 (0.167)	264* (0.259)	2.18

(\*) Aglomerados.

La temperatura crítica de transición de fase ( $T_c$ ) para los microgeles entrecruzados con DVA, EGDMA y MBA, fue de 30°C, 32°C y 34°C respectivamente. Además el contenido de entrecruzante no cambio la  $T_c$  medida. El resultado demuestra el impacto de la hidrofobicidad del DVA sobre los microgeles de NIPAAm, mientras que el MBA produce un carácter hidrofílico, ya que es conocido que la copolimerización de la NIPAAm con monómeros hidrófobos decrece su  $T_c$ , mientras que la copolimerización de la NIPAAm con monómeros hidrofílicos o ionizables incrementa la  $T_c$ . La Tabla 4, muestra también el tamaño de las micropartículas a 25 y 50°C. Se calculó la razón de hinchamiento como  $D_{h,25\text{ °C}}/D_{h,50\text{ °C}}$ , para los diferentes microgeles considerando

## Resultados y discusión

que  $D_{h,50\text{ }^\circ\text{C}}$  es el diámetro hidrodinámico en el límite del colapso bajo las condiciones de medición. Se observó que la razón de hinchamiento decrece conforme la proporción de entrecruzante se incrementa para los microgeles entrecruzados con EGDMA o DVA, tal como lo predicen los principios teóricos, ya que a mayor grado de entrecruzamiento de la red estructural polimérica ésta se hincha menos; sin embargo, la razón de hinchamiento se incrementó conforme la concentración de entrecruzante aumentaba en el microgel con MBA lo cual parece contradictorio, sin embargo, esto puede ser atribuido al efecto hidrofílico del MBA como se ha reportado previamente en otro microgeles [Pavlyuchenko *et al.*, 2009]. A 5.0% mol, la razón de hinchamiento sigue la tendencia descrita previamente; por ello, la razón de hinchamiento más pequeño fue observado en los microgeles entrecruzados con DVA y la razón de hinchamiento mayor se observó en los microgeles entrecruzados con MBA. La alta capacidad de hinchamiento de los microgeles entrecruzados con MBA es similar a lo observado para los microgeles elaborados a partir de *N*-vinilcaprolactama [Imaz 2008]. En este trabajo, se reporta también que la hidrofiliicidad del entrecruzante afecta la  $T_c$  de los microgeles y que la proporción de entrecruzante no afecta el tamaño de los microgeles en el estado colapsado como se observó en la Tabla 4.



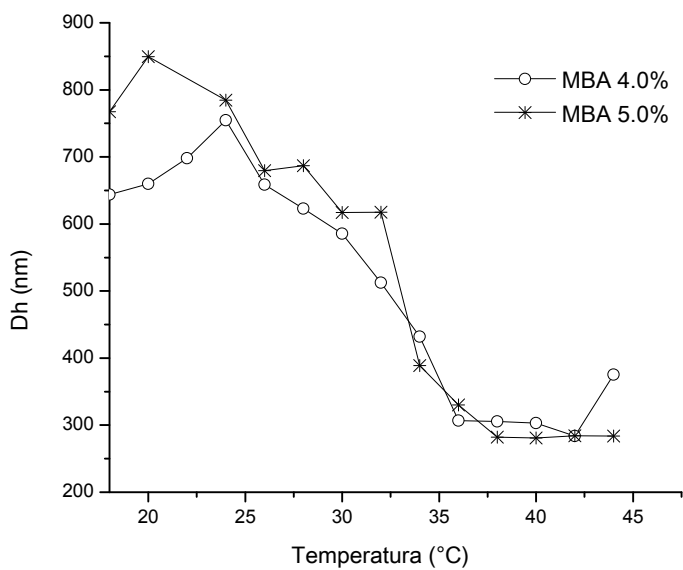
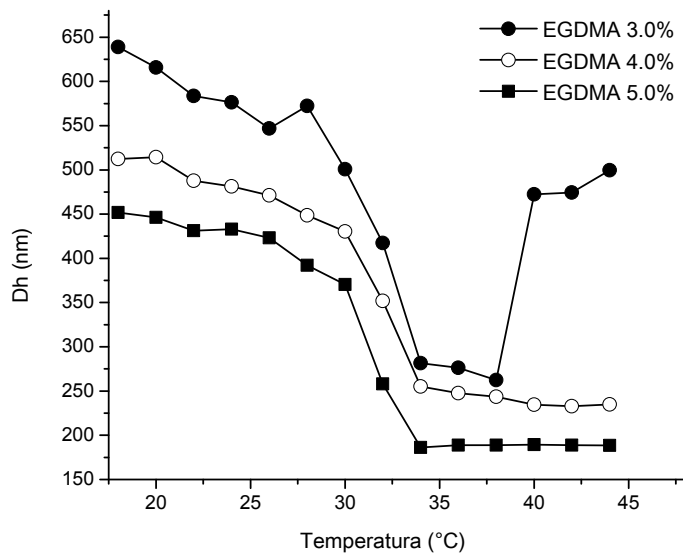


Figura 12. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles de NIPAAm preparados con diferentes entrecruzantes.

### 4.2.6 Micrografías de los microgeles preparados con 5.0% de entrecruzante

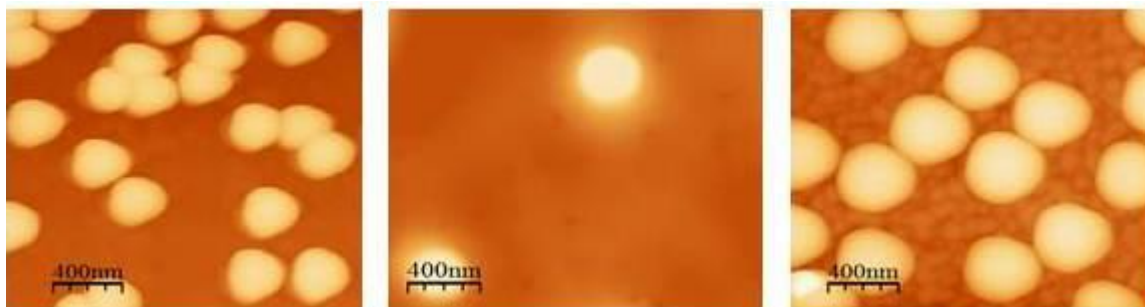


Figura 13. Imágenes de topografías de microgeles de NIPAAm por AFM. Izquierda entrecruzante DVA, centro entrecruzante EGDMA, derecha entrecruzante MBA.

Tabla 5. Dimensiones de las micropartículas con 5.0% mol de entrecruzante.

Entre- cruzante	Ancho /imágenes AFM, (SD) nm	Altura /imágenes AFM, (SD) nm	Volumen a 25°C / DLS <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}^3$ ) $\times 10^6$	Volumen a 50°C / DLS <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}^3$ ) $\times 10^6$	Volumen /imágenes AFM <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}^3$ ) $\times 10^6$
DVA	398 (13)	120 (6)	22.6	4.2	19.9
EGDMA	342 (12)	110 (8)	36.1	6.0	13.5
MBA	460 (14)	95 (2)	130.9	10.8	21.1

<sup>a</sup> calculado como esferas (volumen =  $4/3 \pi r^3$ )

<sup>b</sup> calculado como cilindro (volumen =  $4/3 \pi r^2 h$ )

Las micrografías de AFM de los microgeles preparados con 5.0% mol de entrecruzantes se presentan en la Figura 13 y el análisis en la Tabla 5. Aparentemente, cuando los microgeles se secan sobre la superficie de la mica se deforman asemejándose a “huevos fritos” (siendo el ancho más grande que la altura). Si consideramos a las micropartículas de las imágenes del AFM como cilindros; se puede observar que los volúmenes que ocupan las micropartículas

sobre la mica son del mismo orden de magnitud que el volumen calculado en la medición por DLS de los microgeles a 50°C, excepto para los microgeles entrecruzados con DVA donde el volumen calculado por las imágenes del AFM son más cercanos al volumen por DLS a 25°C (Tabla 5).

Los resultados sugieren que cuando los microgeles entrecruzados con MBA y EGDMA se secan sobre la superficie de la mica, se encojen acercándose al tamaño de los microgeles colapsados. Por otro lado, los microgeles entrecruzados con DVA sólo sufren un pequeño encogimiento durante el proceso de secado. Y como se ha discutido anteriormente, los microgeles entrecruzados con DVA están aparentemente más colapsados que los otros microgeles y eso puede explicar porque los microgeles entrecruzados con DVA no se encojen tanto como cuando se secan sobre la superficie plana. Las microestructuras evaluadas por las mediciones de AFM muestran dimensiones casi homogéneas lo cual concuerda con la polidispersidad relativamente pequeña determinada con mediciones por DLS. Las muestras de micropartículas entrecruzadas con EGDMA para las microscopías de AFM fueron preparadas usando la mitad de la concentración en comparación con otras dos muestras, ya que a esa concentración se formaban agregados de micropartículas en la superficie de la mica usada para sostener el microgel, dificultando los análisis microscópicos.

### **4.3 Estudio de la incorporación de DMAEM en los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA.**

#### **4.3.1 Influencia de la cantidad de entrecruzante y el peso molecular del PEGMA en el tamaño de los microgeles sintetizados con DMAEM**

Primeramente se hicieron dos series, una usando PEGMA con peso molecular de 1,100 g/mol y la otra con PEGMA de peso molecular 2,080 g/mol, en cada serie se hicieron 4 reacciones, dos de ellas con APS 2.0% y DVA al 2.5%, y las otras dos reacciones con AIBA 2.0% y DVA al 5.0%.

## Resultados y discusión

Se observó claramente en la serie con PEGMA<sub>1100</sub> (Figura 14) lo que se esperaba, que al incrementar la cantidad de DVA, el tamaño hidrodinámico se reduce, sin importar los iniciadores. La contracción del volumen del nanogel con la temperatura fue continua, o sea gradual. Al emplear PEGMA<sub>2080</sub>, no hay una diferencia significativa en el tamaño, excepto al usar AIBA, en este caso se observó un mayor tamaño con DVA al 2.5%, también se presentó una tendencia más discontinua al emplear DVA al 2.5% (Figura 15). Se puede afirmar que con PEGMA<sub>2080</sub> se obtienen microgeles de mayor tamaño que con PEGMA<sub>1100</sub>.

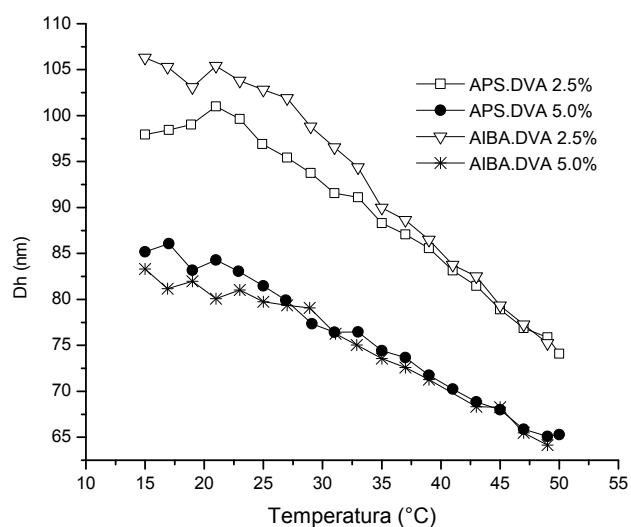


Figura 14. Nanogeles sintetizados con NIPAAm/PEGMA<sub>1100</sub>, DVA 5.0 y/o 2.5%, AIBA y/o APS 2.0% y DMAEM 5.0%, reacciones con AIBA a 70°C

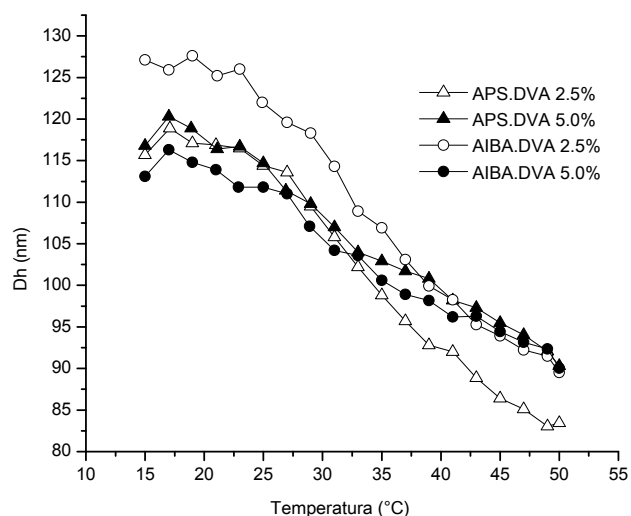


Figura 15. Nanogeles sintetizados con NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 5.0 y/o 2.5%, AIBA y/o APS 2.0% y DMAEM 5.0%. Todas las reacciones con PEGMA<sub>2080</sub> a 85°C

Con base a los resultados anteriores se escogió la formulación de DVA 2.5% y el iniciador AIBA, ya que las micropartículas presentaban: un cambio más discontinuo conforme aumenta la temperatura y un tamaño de  $D_h$  mayor, entre más grandes sean la micropartículas dentro del intervalo de 70-200 nm, éstas tendrán mayor capacidad de cargado, y al presentarse la reducción de su tamaño por cambios en la temperatura esto podría favorecer la expulsión de las sustancias cargadas.

### 4.3.2 Estabilidad al proceso de liofilizado

Como se puede observar en la Tabla 6, las micropartículas presentan una sola distribución antes y después de liofilizarlas. También se puede observar que conforme aumenta el contenido de DMAEM disminuye la uniformidad del tamaño.

Tabla 6. Tamaño de los nano/microgeles antes y después del proceso de liofilización. NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM.

	DMAEM 5 %	DMAEM 15 %	DMAEM 20 %
Tamaño D <sub>h</sub> (nm) <sup>a</sup>	124	111	108
PDI	0.006	0.116	0.168
Tamaño D <sub>h</sub> (nm) <sup>b</sup>	129	97	97
PDI	0.051	0.134	0.235

<sup>a</sup> antes del proceso de liofilizado, (D<sub>h</sub> por intensidad, DLS)

<sup>b</sup> después del proceso de reconstitución

### 4.3.3 Determinación del efecto de la temperatura y pH en el tamaño de los microgeles preparados con diferentes cantidades de DMAEM

Se intentó obtener una micropartícula que contenga el DMAEM en el núcleo, generándose un sitio con cargas positivas, lo cual permitiría cargar a estos nano/microgeles con compuestos con carga negativa, como podría ser: fragmentos de ácidos nucleicos (RNA, DNA), fármacos, macromoléculas, etc. En este trabajo se empleó el antibiótico bacitracina marcada con FITC y la vitamina B12 como compuestos modelo. Una vez que las micropartículas se cargaron y se estabilizaron mediante las interacciones electrostáticas, se pretendió que estos compuestos quedaran protegidos por una capa exterior de PEGMA<sub>2080</sub>. Esta capa exterior evitará que los compuestos cargados sean degradados, también el PEGMA<sub>2080</sub> evitará que los nano/microgeles sean fagocitados y así se aumentará el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo.

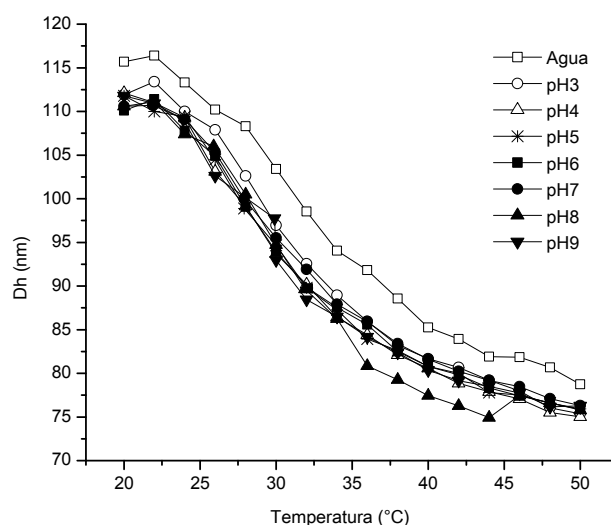


Figura 16. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras de pH diferente. Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 0%.

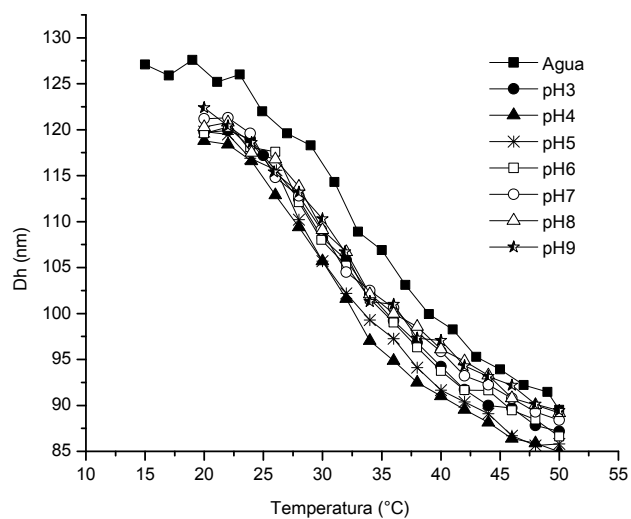


Figura 17. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente. Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 5.0%.

## Resultados y discusión

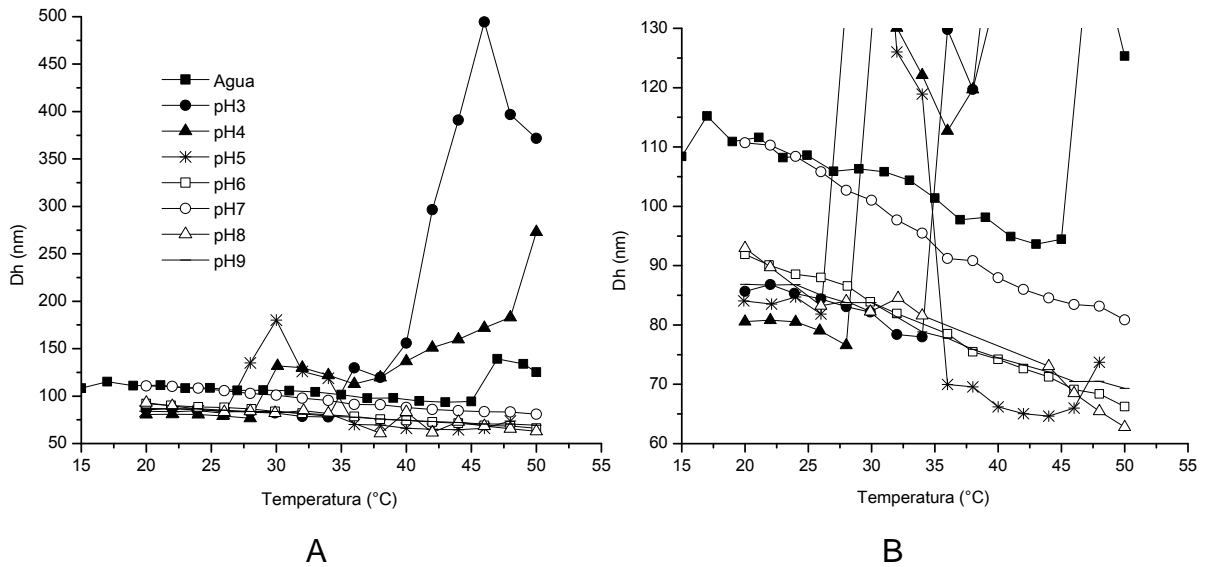


Figura 18. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente (A). Ampliación (B). Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 15.0%.

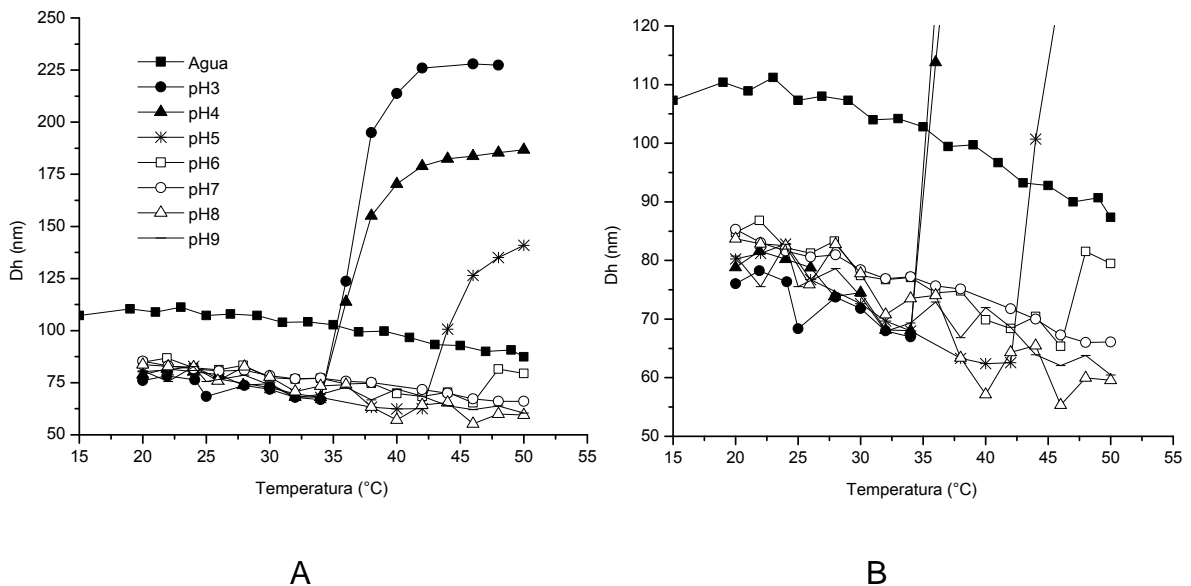


Figura 19. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente (A). Ampliación (B). Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 20.0%.

En la Figura 16, se observa que hay una disminución abrupta del tamaño debido a la presencia de la NIPAAm, también es evidente que el diámetro del nanogel es menor en las soluciones amortiguadoras con pH diferente en comparación con la del agua, esto debido a la presencia de los iones de las soluciones amortiguadoras las cuales tienen 0.1 M de concentración iónica. En la Figura 17, se ve lo mismo pero con una ligera diferencia, después de los 33°C los microgeles presentan diferentes tamaños de colapso, ya que esta muestra contiene un 5.0% de DMAEM. Sin embargo, si el DMAEM estuviese en el centro de la partícula y ésta estuviera ionizada, se esperaría un aumento en el tamaño del microgel a pH ácidos, ya que el DMAEM al ser un grupo básico estaría ionizado, sin embargo esto no se observa. Para la síntesis se usó aproximadamente 3.1 mmoles de NIPAAm con 0.166 mmoles de DMAEM al iniciar la reacción, se considera que estas cantidades no es suficientemente significativa para provocar el cambio esperado. Relación molar NIPAAm/DMAEM=26.72.

En la Figura 18, se puede observar que los microgeles con una mayor cantidad de DMAEM (15.0%), presentan un aumento y disminución de tamaño a pH=5.0 entre 25 y 35°C sin aglomerados, a pH=4.0 se empieza a ver un incremento en el tamaño a partir de los 30°C sin aglomerados excepto a 50°C, y a pH=3.0 el incremento empezó a partir de los 36°C y a los 45°C comenzó a decrecer el tamaño, presentando pocos aglomerados a partir de los 38°C. Se puede pensar que es a partir de estas temperaturas donde empieza el crecimiento del tamaño, posiblemente por el rompimiento de alguna interacción que permite una aglomeración moderada. Para la síntesis de esta muestra la relación molar de NIPAAm con respecto a DMAEM fue de 6.28 (3.14 mmoles de NIPAAm y 0.50 mmoles de DMAEM). A valores de pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0 se observó una tendencia continua.

En la Figura 19, se observa que a pH=3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 el comportamiento es similar al de la figura anterior, hay un aumento en el tamaño de las partículas al

## Resultados y discusión

incrementar la temperatura. A pH=3.0, a 46 y 48°C hay una segunda distribución de tamaño menor alrededor de 48 nm (5.5%); a pH 4.0 y 5.0 no hay presencia de aglomerados grandes, sino solo una distribución; a pH=6.0 a los 48 y 50°C hay presencia de aglomerados (14.0%). En la síntesis de este microgel se usó 3.11 mmoles de NIPAAm y 0.62 mmoles de DMAEM.

Se puede postular que debido a la presencia de DMAEM mayor a 15.0% mol en las nano/micropartículas, a pH ácido el hinchamiento o la aglomeración moderada de las partículas se ve favorecido al incrementar la temperatura; la cual como ya se mencionó rompe algunas interacciones internas en el microgel y esto es lo que favorece el incremento del tamaño por la aglomeración de partículas.

Este comportamiento no se ve en los nano/microgeles hechos con MA 10.0% mol (Figura 20A) y DMAEM 5.0% mol (Figura 17). En las partículas (MA 10.0% mol) se observó lo que se espera de una partícula con un compuesto ácido, que en condiciones ácidas, el grupo ácido no se encuentra ionizado, por lo cual la partícula tiene un menor tamaño que en condiciones básicas, en donde los grupos ácidos están ionizados provocando así el hinchamiento de las partículas.

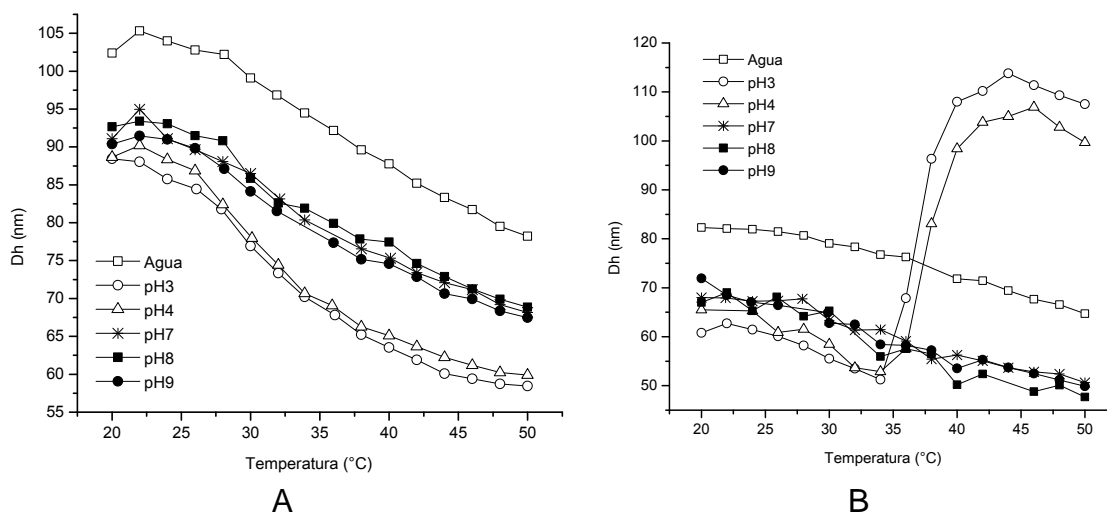


Figura 20. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente. Muestra (A) NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y MA 10.0%, muestra (B) en lugar de AIBA, APS 2.0%

## Resultados y discusión

Lo que resulta interesante es que cuando se cambia de un iniciador catiónico (AIBA) a uno aniónico (APS) en las nano/micropartículas con MA 10.0% mol, se obtenga el comportamiento observado en la (Figura 20B), se comporta similar a los nano/microgeles hechos con DMAEM 15.0, 20.0% mol y MA 20.0% mol, todos estos con AIBA 2.0% (Figura 21). Lo cual nos sugiere que las partículas con DMAEM 15.0, 20.0% mol están parcialmente hidrolizadas lo cual genera un grupo ácido y esto es lo que da el mismo comportamiento que las partículas de la (Figura 20B).

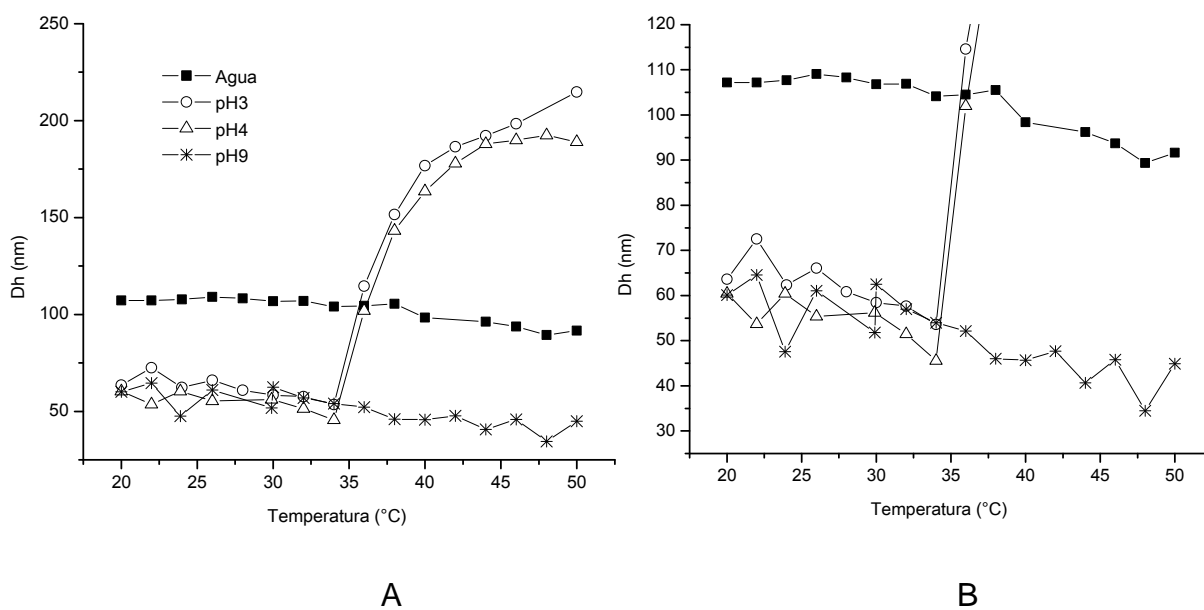


Figura 21. Efecto de la temperatura en el tamaño de los microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente (A). Ampliación (B). Muestra sintetizada con: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y MA 20.0%

### 4.3.4 Determinación del contenido del DMAEM en los microgeles por medio de titulación ácido-base

Para determinar el contenido de grupos básicos en las micropartículas, se recurrió a la titulación ácido-base. Es necesario mencionar algunos puntos de partida antes del análisis de los resultados.

- a) El iniciador AIBA es una base fuerte con un  $pK_a=11.0$  [Luna-Xavier et al., 2002].
- b) El monómero DMAEM pudo haber sufrido parcialmente una hidrólisis, por lo cual puede haber presencia de grupos ácidos en las partícula  $[R_1CH_2C(CH_3,R_2)COOH]$  y una pérdida del grupo amino  $[HOCH_2CH_2N(CH_3)_2]$ . La hidrólisis puede llevarse a cabo bajo las siguientes condiciones: en soluciones diluidas acuosas (DMAEM 0.5-2.0 M) a  $pH>7.0$ , y se acelera al cuaternizarse los grupos amino. [Kuznetsova et al., 2003].
- c) En la Tabla 4.3.2 se tiene el pH de la solución de las muestras antes de ser tituladas, diluidas en KCl 0.5 M.

Tabla 7. pH de las soluciones de los nano/microgeles antes de titular.

iniciador		AIBA		
% DMAEM	0	5.0	15.0	20.0
<b>pH.</b>	<b>6.29</b>	<b>5.58</b>	<b>5.62</b>	<b>5.46</b>
iniciador		AIBA	APS	
% MA	10.0	20.0	10.0	
<b>pH.</b>	<b>5.60</b>	<b>5.86</b>	<b>5.22</b>	

(%, en base a moles de NIPAAm)

En el Anexo 7.3 se tienen las gráficas de titulación que se hicieron primeramente utilizando KOH 0.0848 M como titulante, ya que como se ve en la

## Resultados y discusión

Tabla 7, se partió de un pH inicial de solución ligeramente ácido. En las gráficas se observó que hay un ligero aumento en los mL requeridos del titulante para producir un punto de inflexión conforme aumenta el % de DMAEM (12.0-97.2 mg) empleado en la síntesis (Anexo 7.3, gráficas superiores). Se observó que para las muestras hechas con 0.0, 5.0, 15.0 y 20.0 % de DMAEM los mL de titulante consumidos fueron de 0.02, 0.05, 0.06, y 0.08 mL respectivamente. Los resultados de las muestras con 5.0, 15.0 y 20.0% de DMAEM tuvieron  $4.18 \times 10^{-6}$ ,  $5.11 \times 10^{-6}$  y  $6.74 \times 10^{-6}$  moles de MA, lo cual es producto de la hidrólisis del DMAEM. En base a lo anterior se calculó un 61.0, 34.3 y un 36.8% de hidrólisis, aproximadamente este porcentaje concuerda con el % de incorporación del DMAEM calculado en el Tabla 9, en donde hay un porcentaje menor de incorporación para la muestra que se sintetizó con DMAEM al 5%.

Al ver las gráficas del Anexo 7.4, correspondientes a las muestras con MA se ve el mismo comportamiento, las muestras con 10.0% y 20.0% de MA (26.9 y 54.4 mg) requirieron 0.03 y 0.04 mL de KOH respectivamente, mientras que la muestra hecha con 10.0 % de MA y APS 2.0% requirió de 0.05 mL, en la Tabla 8, se resume los resultados, los cuales sugieren que hay una mejor incorporación del MA usando el iniciador aniónico APS, (los cálculos están en el Anexo 7.6).

Tabla 8. Determinación del contenido del MA en los microgeles por medio de titulación ácido-base.

nano/ microgel	% MA <sup>a</sup>	% Conversión	% <sub>w/w</sub> MA esperado	% <sub>w/w</sub> MA calculado	% incorporado de MA
AIBA	10	48.8	4.58	2.15	47.82
AIBA	20	40.3	9.19	2.18	23.58
APS	10	56.9	5.45	2.73	49.31

<sup>a</sup> (en base a los moles de NIPAAm), se empleó KOH 0.0848 M como titulante.

## Resultados y discusión

Se ha reportado que se favorece más el rendimiento de la polimerización de metacrilatos usando un iniciador aniónico en vez de uno catiónico, lo cual se puede observar en este caso de las muestras con MA en donde se tiene un % de incorporación ligeramente mayor usando APS en vez de AIBA.

Enseguida se continuó con una retrotitulación usando HCl 0.1053 M para bajar el pH de la solución a un pH=2.0, y así protonar los grupos básicos. Las gráficas de la parte inferior del Anexo 7.3 y 7.4 (nanogeles con DMAEM y MA) corresponden a la segunda titulación.

Se espera la presencia de dos grupos básicos correspondientes al iniciador AIBA y al del DMAEM, y en las gráficas no se nota una diferencia marcada entre las dos bases, por lo cual los cálculos se hicieron por diferencia del porcentaje de base (5.07%<sub>w/w</sub> calculado por presencia del iniciador AIBA en la muestra del nano/microgel sin DMAEM). Los resultados de la Tabla 9, fueron determinados de acuerdo a su gráfica correspondiente de titulación y a los cálculos del Anexo 7.7.

Tabla 9. Determinación del contenido del DMAEM en los microgeles por medio de titulación ácido-base.

% DMAEM <sup>a</sup>	% Conversión	% <sub>w/w</sub> AIBA esperado	% <sub>w/w</sub> calculado de AIBA	% <sub>w/w</sub> esperado DMAEM	% <sub>w/w</sub> calculado DMAEM	% incorporado de DMAEM
0	72.5	2.82	5.07	N/A	N/A	N/A
			% <sub>w/w</sub> calculada de BASE			
5	58.7	2.80	8.00	4.56	2.92	64.15
15	47.6	2.40	15.26	12.51	10.20	81.48
20	48.0	2.40	17.90	15.38	12.80	83.18

<sup>a</sup> (en base a los moles de NIPAAm)

Nota: nano/microgeles NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%

Como ya se mencionó el DMAEM aparentemente sufrió hidrólisis. A mayor porcentaje de DMAEM utilizado en la síntesis se ve un porcentaje de

incorporación mayor, aunque en el porcentaje de conversión sea lo contrario, el cual es la relación de sólidos totales iniciales en la reacción y los sólidos totales después de la purificación y liofilización.

Se hizo la misma retro-titulación con las muestras de MA solo para tenerlas como referencia, las gráficas están en el Anexo 7.4 parte inferior; en tales gráficas la base corresponde al KOH empleado como titulante al inicio.

### 4.3.5 Determinación del potencial Z de los nano/microgeles

En la Figura 22, se puede observar que a pH=3.0 existe una carga positiva, debido a que se cuenta con un iniciador catiónico AIBA, lo cual nos confirma que este se encuentra en la superficie del nano/microgel. También se observa que a partir de pH=5.0 se ve un aumento en la carga negativa de la superficie conforme hay un aumento en el contenido del grupo básico DMAEM.

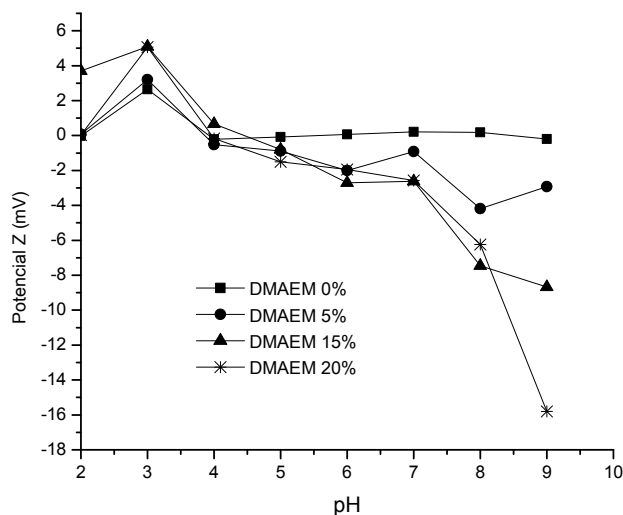


Figura 22. Potencial Z de nano/microgeles en soluciones amortiguadoras con pH diferente, (NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM).

## Resultados y discusión

Lo anterior puede explicarse si después de pH=5.0 existe una hidrólisis o si el DMAEM ya se encontraba hidrolizado. Cabe mencionar que en agua el potencial Zeta correspondiente a cada muestra son los siguientes [DMAEM %, (mV)]: [0%, 0.0 mV], [5.0%, -2.72 mV], [15.0%, -2.61 mV] y [20.0%, -2.62 mV].

En la Tabla 9, se reporta el pH inicial de la solución de los nano/microgeles después de la purificación. Se determinó que cuando se usó como iniciador al APS la solución está relativamente más ácida después de la purificación, y se ve claramente que al no adicionar DMAEM en la síntesis el pH de la solución es más alcalina. Como ya se observó en la sección anterior, la presencia de DMAEM proporciona cierta acidez, debido a la hidrólisis parcial del DMAEM. Lo cual concuerda con los resultados del potencial Zeta en donde se ve un aumento en las cargas negativas conforme se aumenta la cantidad de DMAEM, en soluciones amortiguadoras con pH básicos (Figura 22). Cabe mencionar que en agua el potencial Zeta correspondiente a cada muestra son los siguientes [iniciador, (mV)]: [AIBA, -0.105 mV], [APS, -0.0632 mV].

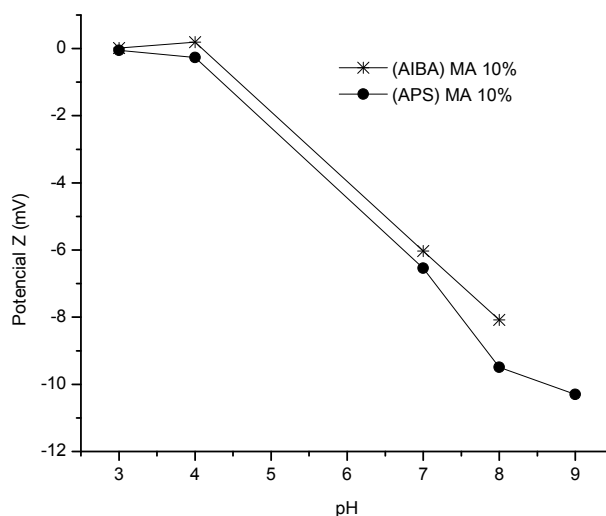


Figura 23. Potencial Z de nano/microgeles en soluciones amortiguadoras con diferente pH. (NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA y/o APS 2.0% y MA 10.0%).

Como comparación se tienen muestras en donde se empleó MA en vez de DMAEM, en la Figura 23, se puede observar casi el mismo comportamiento que en nano/microgeles de DMAEM, en donde aumenta la carga negativa del potencial zeta conforme se aumenta el pH de la solución amortiguadora. Con los grupos MA esto es lo que se espera, ya que al tener grupos ácidos, éstos se ionizan en soluciones más alcalinas. Todavía no queda claro por qué en las muestras con DMAEM sucede lo mismo, que es contrario a lo esperado, en donde por ser un grupo básico, su ionización se espera a pH menores con cargas positivas. Por otro lado, si el DMAEM estuviera en el centro de la partícula, al ionizarse se esperara un hinchamiento de la partícula a pH ácidos, lo cual si sucede como se vio en el punto 4.3.3; pero lo mismo sucede en la muestra de la Figura 20B, en donde se usa APS y MA. Se podría pensar que el DMAEM está en el núcleo y que el hidrolizado de DMAEM (MA) está en la superficie y por ello el potencial Z es negativo.

### **4.3.6 Micrografías de los nano/microgeles (TEM)**

Se escogió una muestra del nano/microgel con el mayor contenido de DMAEM (20.0%), para ser analizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se utilizó el ácido fosfotúngstico (o fosfotungsténico), este ácido tiene múltiples cargas negativas que interactúan con las cargas positivas de la superficie de fosfolípidos (o sobre los grupos amino protonados de la colina) [Zhang et al., 2010].

En la Figura 24, se puede ver que toda la superficie de la partícula esta interactuando con el colorante de contraste utilizado, lo que nos puede indicar que en la superficie se encuentra moléculas del iniciador catiónico AIBA, y no queda claro en esta micrografía si las moléculas del DMAEM están orientadas hacia el núcleo o superficie, o uniformemente en todo el nano/microgel. También se puede corroborar el tamaño de las partículas del microgel mediante esta microscopia (menor a 100 nm por el secado), para compararlo con el tamaño del

diámetro hidrodinámico obtenido por DLS (aprox. 100 nm, nanogel hinchado Figura 19).

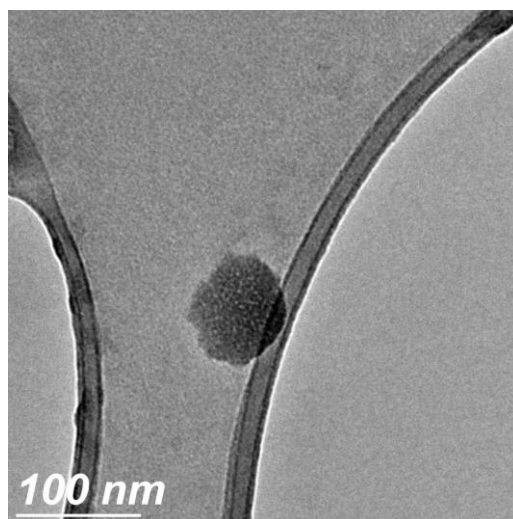


Figura 24. Microscopía TEM de la muestra del microgel sintetizado a partir de nano/microgel NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0% y DMAEM 20.0%, usando la técnica de polimerización por emulsión libre de detergente.

### 4.3.7 Análisis del espectro de FT-IR

Se analizaron cuatro muestras, todas sintetizadas con NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>/DVA2.5%, la diferencia entre ellas se describe a continuación. Las muestras contienen lo siguiente: muestra “AIBA” (AIBA 2.0% / DMAEM 0%), muestra “MA 10.0%, APS” (APS 2.0% / MA 10.0%), muestra “MA 10.0%, AIBA” (AIBA 2.0% / MA 10.0%), y muestra “DMAEM 20.0%, AIBA” (AIBA 2.0% / DMAEM 20.0%)

En la primer parte del espectro se muestran las absorciones IR en el intervalo de longitud de onda de 2600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , en donde la absorción alrededor de 3200  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la transición de vibración de estiramiento

del (N-H), entre 2970 y 2870  $\text{cm}^{-1}$  se presenta la absorción correspondiente a la transición de vibración de estiramiento del (C-H) alifático.

En la segunda parte del espectro se muestran las absorciones en el intervalo de longitud de onda de 600 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ ; a 1719  $\text{cm}^{-1}$  se presenta la absorción correspondiente a la transición de vibración de estiramiento de (C=O) del éster, a 1642  $\text{cm}^{-1}$  se presenta la absorción a la transición de vibración de estiramiento del (C=O) de la amida (NIPAAm), a 1538  $\text{cm}^{-1}$  se tiene la absorción IR a la transición de flexión de (N-H), (Anexo 7.18).

No se encuentra una diferencia significativa entre las muestras, solo se reafirma que el pico de mayor intensidad en todas las muestras fue la correspondiente a la amida de la NIPAAm a 1642  $\text{cm}^{-1}$ , ya que esta se encuentra en mayor proporción que todos los demás reactivos. Al comparar la “pansita” que sale a 1719  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al éster del DMAEM, se observó que la muestra que contiene mayor contenido de DMAEM (20.0%) presenta una mayor intensidad en esa área que las otras muestras, lo que podría indicar una mayor proporción de DMAEM, ya que todas las muestras contienen la misma cantidad de PEGMA.

#### 4.4 Marcado de la bacitracina con FITC

Con las cantidades que se utilizaron para la síntesis de bacitracina marcada (punto 3.7.3), se está favoreciendo la unión de una sola molécula de FITC a la bacitracina, se espera que este producto sea el mayoritario, Anexo 7.8. Se empleó la técnica de cromatografía de capa fina para corroborar el marcado de la bacitracina, el solvente usado como eluyente fue una mezcla de hexano/acetona 50%. Se obtuvieron 30.7 mg de BAC-FITC.

Se realizó la curva estándar en el fluorómetro para conocer la concentración mínima y máxima de las diluciones de muestra a leer, en el anexo 7.9 se puede ver la curva estándar en donde los límites inferior y superior de la

concentración son de 2.0 mcg y 50.0 mcg, arriba y debajo de estas concentraciones el equipo ya no distingue y da valores constantes.

### **4.5 Cargado de los nano/microgeles**

Los experimentos para incorporar la bacitracina y la vitamina B12, se realizaron por el método de equilibrio. Los nanogeles que se utilizaron fueron los de composición NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>/DVA2.5%mol/DMAEM20%mol sintetizados con el iniciador AIBA ya que fueron las que contenían un mayor porcentaje de DMAEM y presentaban una mejor transición de fase de volumen en comparación de los otros compuestos sintetizados con DMAEM.

#### **4.5.1 Cargado de los nano/microgeles con BAC-FITC**

Las partículas cargadas con BAC-FITC no se utilizaron ya que al momento de hacer la separación de la BAC-FITC no cargada por medio de diálisis no se alcanzó una separación a las 24 h lo indica una difusión muy lenta y no conveniente para estudios de liberación, por lo cual se optó por utilizar la vitamina B12 como soluto de prueba.

#### **4.5.2 Cargado de los nano/microgeles con vitamina B12**

Al hacer los cálculos a partir de la intensidad de absorbancias obtenidas de la solución madre (0.701) y de la dilución 1:12.5 (0.062) dieron una concentración en la solución madre de 0.039 mg/mL y 0.040 mg/mL respectivamente (Anexo 7.12); por lo tanto al realizar los cálculos correspondientes se obtuvo un porcentaje de cargado de 2.4% y 2.5%.

A partir de los datos del punto 3.7.4 y tomando en cuenta que se obtuvo un peso de 44.8 mg de nanogeles cargados después de liofilizar, se calculó una eficiencia del 13.5%, Anexo 17.13 (% Eficiencia<sup>1</sup>). Al comparar los resultados con los

obtenidos por nanogeles aniónicos (16% de cargado y 46% de eficiencia con doxorubicina), producidos en un trabajo anterior en el laboratorio NIPAAm/PEGMAM/DVA5%mol/MAOB10%mol (Serrano et al., 2011), se puede observar que las nanopartículas obtenidas en este trabajo de investigación tiene un cargado muy bajo.

### **4.5.3 Liberación de los nano/microgeles cargados con vitamina B12**

Estos experimentos se realizaron variando la temperatura de liberación y el pH del medio con el objetivo de analizar la aplicación del nano/microgel en la liberación controlada de fármacos en condiciones fisiológicas normales de circulación sanguínea y condiciones neoplásicas de una célula.

Para cuantificar la cantidad de vitamina B12 liberada, con respecto a la absorbancia se utilizó la curva estándar mostrada en el Anexo 7.10 y 7.11; y para obtener la fracción liberada con respecto al tiempo, se utilizaron los datos del Anexo 7.14 al 7.17.

De acuerdo a los resultados de tendencia de la Figura 19, donde en un medio a pH 7 el tamaño de partícula decrece ligeramente conforme aumenta la temperatura (a 38°C las partículas muestran un tamaño de 75.0 nm y a 42°C un tamaño de 71.0 nm); coincide con lo que se observa en la gráfica de liberación de la vitamina B12 en un medio a pH de 7.4 (Figura 25). Se ve una liberación más rápida a 42°C que a 37°C, se puede decir que es debido a que el tamaño de partícula es menor a 42°C y por esta razón pudo haber expulsado más pronto a la vitamina que a menor temperatura. Aun así, se tiene una fracción de liberación mayor (0.92) a 37°C que a 42°C (0.79).

Los resultados se acercan a la característica que se busca: liberar dentro de una célula cancerígena la cual tiene su temperatura más elevada (aprox. 40°C) que una célula normal, y no liberar durante el transporte en el torrente sanguíneo. Si estos nanogeles tardaran el menor tiempo posible en el torrente sanguíneo, y

se depositaran en la célula cancerígena, serian buenos candidatos para acercarse al objetivo deseado.

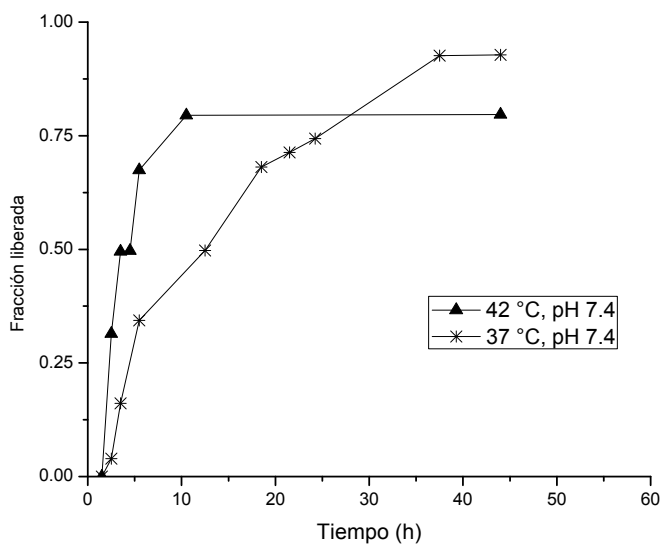


Figura 25. Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12 en un medio con pH de 7.4

Al hacer las mismas comparaciones con las gráficas de tendencia en medios de diferentes valores de pH, se tiene los siguientes datos de la Figura 19: en un medio con pH 5.0 a 38°C se tienen partículas con un tamaño de 63.0 nm y a temperatura de 42°C se tiene un tamaño de 62.5 nm pero se tiene un tamaño mayor a temperatura de 44°C de 100.0 nm. Se podría pensar que lo anterior concuerda con la Figura 26, ya que a 37°C al parecer las partículas están en menor tamaño en comparación que a 42°C, por tal motivo se ve una liberación más rápida.

Debido que dentro del intervalo de lectura del equipo entre 42 y 44°C hay un incremento de tamaño, se cree que en este caso las partículas se encuentran con un tamaño mayor o se empiezan aglomerar, lo cual disminuye el proceso de liberación. Lo cual no afectaría en mucho al objetivo que se busca de liberar

## Resultados y discusión

adentro de una célula cancerígena, ya que una vez adentro la rapidez no afectaría tanto. Aunque en este estudio se usó vitamina B12 para ser cargado, en un futuro se puede buscar un fármaco antineoplásico.

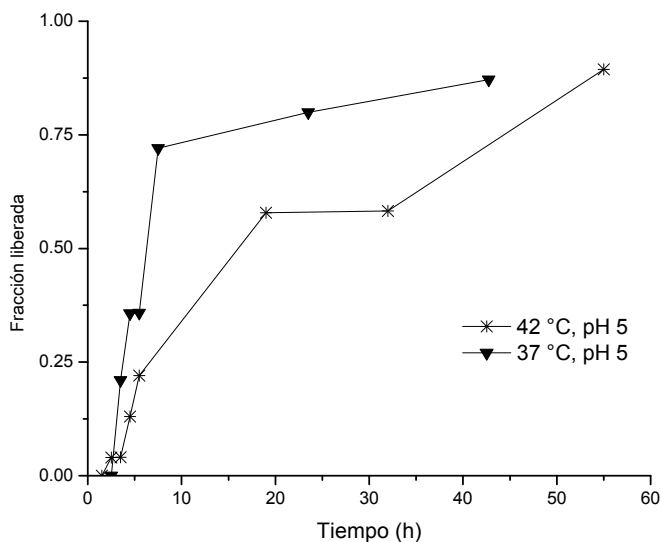


Figura 26. Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12, en medio a pH 5.0

Al calcular el porcentaje de cargado de las nanopartículas a partir de los datos del estudio de liberación se obtuvo un % de cargado en un intervalo de 2.23 a 5.82%, (Anexo 7.13, % Eficiencia<sup>2</sup>). Estos porcentajes junto con el calculado inicialmente (2.4%) son aproximados, ya que se debe tomar en cuenta que el producto liofilizado contenía residuos de vitamina B12 que no se integraron dentro de los nanogeles. Aunque al final de los estudios de liberación, tres de las soluciones dentro de las membranas tienen casi la misma concentración como se puede ver en la Tabla 10, se podría tomar estos valores como concentración infinita ya que no presentaron grandes diferencias entre ellos.

Tabla 10. Datos a partir de los estudios de liberación.

pH del medio	Temperatura (°C) en la liberación	mg de muestra <sup>1</sup>	ABS dentro de la membrana	mg Vit.B12 liberados	% de cargado
pH 7.4	37	4.7	0.040	0.2584	5.82
pH 5	37	4.6	0.032	0.1005	2.23
pH7.4	42	4.7	0.049	0.1165	2.54
pH 5	42	4.6	0.038	0.176	3.98

1) muestra contenida dentro de la membrana diluida en 10.0mL de medio.

Por otro lado, se ha documentado que nano/microgeles con DVA se degradan más fácilmente a pH ligeramente ácidos. En nuestro caso, se tomaron las muestras del estudio de liberación una vez que había terminado el experimento, como se ve en la Tabla 10 y Figura 27.

Se observó que ambas muestras de la liberación a pH 7.4 presentaron menor degradación, (tienen dos distribuciones, una de ellas entre 66.0 y 70.0% con un tamaño entre 80-89 nm) mientras que las otras muestras en medio a pH 5.0 presentaron tres distribuciones, una de ellas entre 23.0 y 62.0% con tamaño entre 62-70 nm. En otras muestras; independientes al estudio de liberación, que se monitorearon por tres días a pH ácidos no se logró ver dicha degradación, en la Figura 4.5.4 se puede ver como al aumentar y disminuir de temperatura en un periodo de 27 hrs a la misma muestra, esta fue capaz de recuperar su tamaño inicial a los 25°C de una sola distribución 78 nm. El mismo tamaño de partícula presentado en días posteriores.

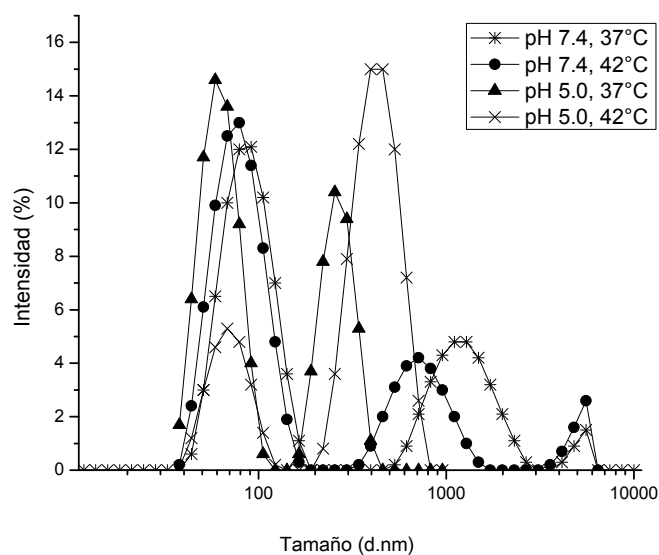
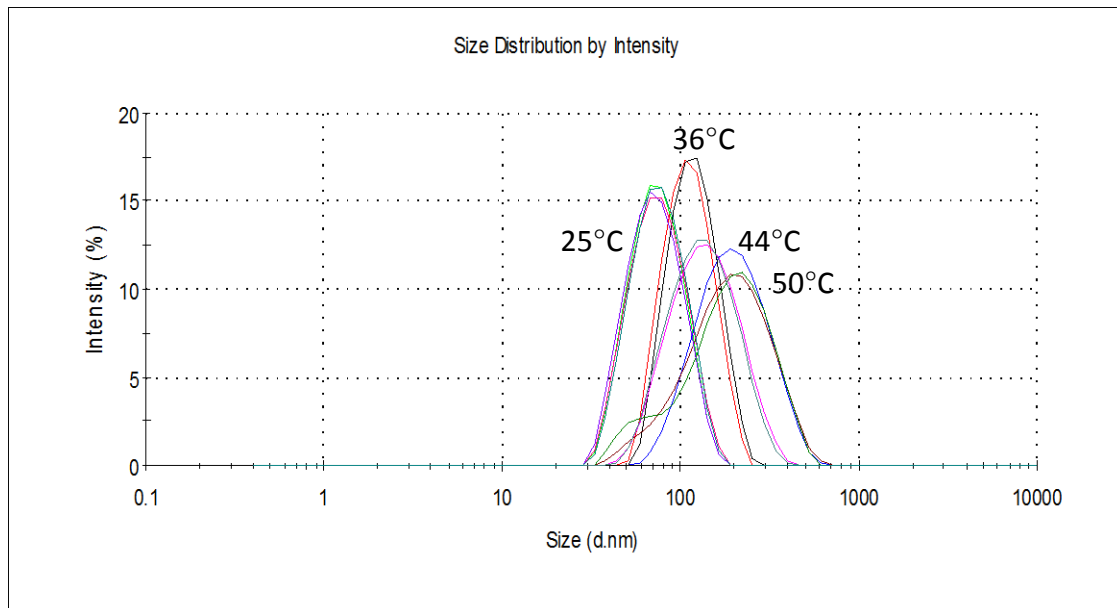


Figura 27. Distribución de tamaños por intensidad (DLS).

Tabla 11. Determinación del tamaño de los microgeles después del proceso de liberación.

pH del medio	Temperatura (°C) en la liberación	Tamaño (nm)	% de la distribución	PDI	Tiempo *
pH 7.4	37	89.43	66.0	0.60	35 días
pH 5	37	12.68	31.0	0.36	4 días
		62.7	62.0		
pH 7.4	42	266.3	38.2	0.52	9 días
		80.53	70.0		
pH 5	42	749	24.0	0.46	9 días
		70.68	23.8		
		433	78		

\* (tiempo transcurrido desde el tiempo cero de liberación hasta la determinación del tamaño en las muestras dentro de la membrana)



NOTA: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>/DVA 2.5% mol / DMAEM 20% mol en un medio a pH3.0.

Figura 28. Distribuciones de tamaño de los microgeles en ciclos altos y bajos de temperatura en un periodo de 27 horas.



### **5.1 Influencia de la carga del iniciador en la síntesis de nano/microgeles en la reacción de polimerización por emulsión libre de detergente**

El iniciador no iónico VA-086 no generó partículas estables con ninguno de los tres entrecruzantes (DVA, MBA y EGDMA).

Los iniciadores iónicos APS, KPS y AIBA si formaron nanopartículas estables con el entrecruzante DVA.

Empleando el iniciador catiónico AIBA, las partículas con DVA tienen una mejor distribución de tamaños en comparación con las que contienen EGDMA; y las partículas con MBA tienen una distribución de tamaños muy heterogénea.

### **5.2 Estudio del efecto del entrecruzante en el tamaño de partícula mediante la reacción de polimerización por dispersión**

Cuando en las reacciones se utilizó APS 4.0%, se obtuvieron microgeles de NIPAAm con diferentes tamaños y comportamientos de hinchamiento usando diferentes entrecruzantes. El efecto puede ser producto de las características hidrofílicas/hidrofóbicas de los entrecruzantes. DVA generó hidrogeles pequeños con una razón de hinchamiento reducido, MBA produjo microgeles más grandes con una razón de hinchamiento mayor, mientras que EGDMA presentó un comportamiento intermedio. Al incrementar la cantidad de entrecruzante usado en la síntesis, la razón de hinchamiento para los microgeles entrecruzados con DVA y EGDMA decreció, mientras que para MBA se observó un incremento en el hinchamiento del microgel, demostrando un efecto considerable del tipo de entrecruzante en el tamaño y comportamiento de hinchamiento en los microgeles preparados bajo las mismas condiciones.

### 5.3 Estudio de la incorporación de DMAEM en los nano/microgeles de NIPAAm/PEGMA

En los estudios de titulación ácido/base y en los de potencial Z, se demostró que hay una hidrólisis. Se calculó un 61.0, 34.3 y 36.8% de hidrólisis correspondiente a las muestras con DMAEM al 5.0, 15.0 y 20.0%. También por los estudios de titulación ácido/base se comprobó que si hubo una incorporación del grupo DMAEM en las partículas del 64.1, 81.5 y 83.1% correspondiente en el mismo orden a las muestras mencionadas.

En una solución amortiguadora de pH=3.0, se presentaron valores positivos de potencial Z lo cual se debe a los grupos ionizados del iniciador AIBA y se puede decir que también parte del DMAEM se ionizó. Al colocar los nano/microgeles en solución amortiguadora de pH=9.0 se ve más claramente la presencia de grupos ácidos ionizados (MA), los cuales provienen de la hidrólisis del DMAEM; entre mayor contenido de DMAEM utilizado en la síntesis hubo una mayor carga negativa en la superficie.

No queda claro en la micrografía (TEM) si las moléculas del iniciador AIBA y del DMAEM quedan orientadas hacia el núcleo o superficie, o están uniformemente en todo el nano/microgel.

Los nano/microgeles presentaron bajo porcentaje de cargado de vitamina B12 (2.4%) en comparación con otros materiales ya estudiados, sin embargo presentan un comportamiento favorable en las liberaciones bajo las condiciones requeridas para una aplicación de liberación de fármacos.

Los nano/microgeles NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub> / DVA 2.5% mol / DMAEM 20.0% mol usados para los estudios de liberación si tienen respuesta a cambios de temperatura y pH en el medio. Disminuyen su tamaño en aprox. 10.0 nm al incrementar 0.1 M la fuerza iónica del medio. En medios con un pH mayor a 7.0, estas partículas no modifican su tamaño significativamente conforme aumenta la temperatura en un intervalo de 20 a 50°C, al contrario de los nano/microgeles

## Conclusiones

---

semejantes hechos sin DMAEM y con 5.0 % de DMAEM, los cuales lo hacen discontinuamente. En medios con un pH menor a 7.0, a partir de una temperatura 33°C los nano/microgeles en cuestión presentan aglomeración, lo cual los nano/microgeles semejantes hechos sin DMAEM y el 5.0 % de DMAEM no lo presentan.

Al comparar los estudios de liberación a pH=7.4, los nano/microgeles liberan ligeramente más lentamente a una temperatura de 37 que a 42°C, a 37°C libera aproximadamente un 75% en forma gradual en un periodo de 25 h y a 42°C lo hace en 10 h. La respuesta de liberación es opuesta en un medio a pH=5.0, libera más rápido a 37°C, aproximadamente un 75% en 5 h, y a 42°C lo hace alrededor de 45 h.



### 6.1 Referencias

- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **2008**; 5 (4), 505-515.
- Aulenta, F., Hayes, W., Rannard, S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *Eur. Polym. J.* **2003**; 39,1741-1771.
- Bader, H., Ringsdorf, H., Schmidt, B., Watersoluble polymers in medicine. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1984**; 123/124, 457–485.
- Ballauff, M., Lu, Y. “Smart” Nanoparticles: preparation, characterization and applications. *Polymer* **2007**; 48, 1815-1823.
- Bontha, S., Kabanov, A. V., Bronich, T. K. Polymer micelles with cross-linked Ionic cores for delivery of anticancer drugs. *Journal of Controlled Release* **2006**; 114, 163-174.
- BSI, standard publication. Nanoparticles-vocabulary. PAS 71; 2<sup>nd</sup> ed. Agosto **2011**; Pp.3
- Chingunpituk, J. Nanosuspension technology for drug delivery. *Walailak J. Sci. & Tech* **2007**; 4 (2), 139-153.
- Chiriac, A. P., Nita, L. E., Nistor, M. T. Upon the emulsion polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate with 3,9-divinyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5]-undecane. *colloids and surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**; 381, 111-117.
- Choi, J. H., Jang, J.Y., Joung, Y.K., Kwon, M.H., Park, K.D. Intracellular delivery and anti-cancer effect of self-assembled heparin-Pluronic nanogels with RNase A. *Journal of Controlled Release.* **2010**; 147, 420-427.
- Fang, J., Nakamura, H. y Maeda, H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**; 63, 136-151.
- Fisher, O.Z., Kim, T., Dietz, S.R. y Peppas, N.A. Enhanced core hydrophobicity, functionalization and cell penetration of polybasic nanomaterials. *Pharmaceutical Research* **2009**; 26 (1), 51-60.
- Folkman, J., Long, D. M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *J. Surg. Res.* **1964**; 71,139–142.
- Gabizon, A. A., Applications of liposomal drug delivery systems to cancer therapy. In *Nanotechnology for Cancer Therapy*, Amiji, M. M., Ed. CRC Press: Boca Raton, **2007**; 595–611.
- García-Sánchez, J. E., Garcia, E. y Merino, M.L. Cien años de la bala mágica del Dr. Ehrlich (1909-2009). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2010**; 28(8), 521-533.
- Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**; 69, 1-9.

- Gregoriadis, G.; Ryman, B. E., Liposomes as carriers of enzymes or drugs – new approach to treatment of storage diseases. *Biochemical Journal* **1971**; *124* (5), Pp. 58.
- Gottesman, M. M., Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**; *53*. 615-627
- Hayashi, H., Iijima, M., Kataoka, K., Nagasaki, Y. pH-sensitive nanogel possessing reactive PEG tethered chains on the surface. *macromolecules* **2004**; *37*, 5389-5396.
- Hu, Z. B., Lu, X. H., Gao, J., Wang, C. J., *Advance Materials* **2000**; *12*, 1173
- Imaz A, Forcada J. N-vinylcaprolactam-based microgels: effect of the concentration and type of cross-linker. *J Polym Sci* **2008**; *46*, 2766–2775.
- Jacobs, C., Kayser, O., Muller, R.H., Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *Int. J. Pharm.* **2000**; *196*, 161–164.
- Jain, K. K. *Methods in molecular biology*. Vol. 437: Drug Delivery Systems: An Overview. Springer-Verlag New York LLC, F. **2008**; *1*, 1-49.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. *Neuroimmune pharmacology*, Springer, *Polymer Nanomaterials*, **2008**; *47*, 691-707.
- Kabanov, A.V., Vinogradov, S.V. Nanogels as pharmaceuticals carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**; *48*, 5418-5429.
- Kuznetsova, N.A., Kazantsev, O.A., Shirshin, K. V., Khokhlova, T.A. y Malyshev, A. P. Hydrolysis of N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and its salts in concentrated aqueous solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry* **2003**; *76* (7), 1117-1120.
- Lee, W., Yeh, Y. Effect of Porosigen and hydrophobic monomer on the fast swelling-deswelling behaviors for the porous thermoreversible copolymeric hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science.* **2006**; *100*, 3152-3160.
- Leobandung W. Ichikawa H. Fukumori Y. Peppas NA. Lin, C. L., Chiu, W.Y. Lee, C. F. Thermal/pH-sensitive core-shell copolymer latex and its potential for targeting drug carrier application. *J. Controlled Release.* **2002**; *80*, 357-363.
- Leobandung W. Ichikawa H. Fukumori Y. Peppas NA. Lin, C. L., Chiu, W.Y. Lee, C. F. Monodisperse nanoparticles of poly(ethylene glycol) macromers and N-isopropyl acrylamide for biomedical applications. *J. Appl Polym* **2003**; *87*, 1678-1684.
- Li, D., Zhong, X., Zeng, Z., Jiang, J., Li, L., Zhao, M., Yang, X., Chen, J., Zhang, B., Zhao, Q., Xie, M., Xiong, H., Deng, Z., Zhang, X., Xu, S., Gao, Y. Application of targeted drug delivery system in chinese medicine. *Journal of Controlled Release* **2009**; *138*, 103-112.
- Lin, C. L., Chiu, W.Y. Lee, C. F. Thermal/pH-sensitive core-shell copolymer latex and its potential for targeting drug carrier application. *Polymer* **2005**; *46*, 10092-10101.

- Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advan. Enzyme Regul.*, **2001**; 41, 189-207.
- Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, and R. Duncan. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of <sup>125</sup>I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release.* **2000**; 65, 133-148.
- Malvern Instruments. Zetasizer Nano Series user Manual. MANO317, 2.1. 2004. Inglaterra. UK. Cap. 14. 14.1-14.8
- Malvern Instruments. Zetasizer Nano Series user Manual. MANO317, 2.1. 2004. Inglaterra. UK. Cap. 16. 16.1-16.11
- Manoharan, C., Basarkar, A., Singh, J. *Pharmaceutical Suspensions; Various Pharmaceutical Disperse Systems.* USA. **2010**;1, 1-37.
- McNeil, S. E. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery methods in molecular biology. *Challenges for Nanoparticles Characterization.*, Springer Science, Business Media, LLC **2011**; 697 (2), 9-15.
- Medeiros, S. F., Santos, A. M., Fessi, H., Elaissari, A. Synthesis of biocompatible and thermally sensitive poly(*n*-vinylcaprolactam) nanogels via inverse miniemulsion polymerization: effect of the surfactant concentration. *Journal of Polymer Science; Part A: Polymer Chemistry* **2010**; 48, 3932-3941.
- Moselhy, J., Vira, T., Liu, F. Wu, X.Y. Characterization of complexation of poly(*N*-isopropylacrylamide-co-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) thermoresponsive cationic nanogels with salmon sperm DNA. *Int. J. Nanomedicine* **2009**; 4, 153-164.
- Motokawa, R., Nakahira, T., Annaka, M., Hashimoto, T., Koizumi, S. Time-resolved gel permeation chromatographic study on poly(*N*-isopropylacrylamide)-block-poly(ethylene glycol) prepared by soap-free emulsion polymerization. *Polymer* **2004**; 45, 9019-9022.
- Motokawa, R. Soap-free emulsion polymerization and phase behavior of poly(*N*-isopropylacrilamide)-block-poly(ethylene glycol) in aqueous media. Tesis, Graduate School of Science and Technology, Chiba University. Japón, **2005**; 4-5.
- Mukesh, D. Nanosuspension technology for solubilizing poorly soluble drugs. *International Journal of Drug Development & Research.* **2012**; 4(4), 40-49.
- Ni, H., Du, Y., Ma, G., Nagai, M., Omi, S. Mechanism of soap-free emulsion polymerization of styrene and 4-vinylpyridine: characteristics of reaction in the monomer phase, aqueous phase, and their interface. *Macromolecules* **2001**; 34, 6577-6585.
- Oh, J.K., Drumright, R., Siegwart, D. J., Matyjaszewski, K., The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* **2008**; 33, 448-477.

- Park, K. Nanotechnology: what it can do for drug delivery. *J. Control Release* **2007**; 120 (1–2), 1–3.
- Pavlyuchenko VN, Ivanchev SS. Composite polymer hydrogels. *Polym Sci Ser A* **2009**; 51, 743–760
- Qiu, L. Y, Bae, Y. H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharmaceutical Research*. **2006**; 23 (1), 1-30.
- Riddick, T.M. Control of colloid stability through zeta potential. Consulting Engineer and Chemist, Thomas M. Riddick and Associates, New York, New York. Capítulo 22, The Application of Basic Concepts of Zeta Potential to Cardiovascular Disease. **1968**.
- Rodriguez, E., Cohen, C., Ober, K.C., Archer, L.A., Principles of polymer systems. 5ta. Edición, Taylor & Francis. **2003**; New York, NY. Pp 104
- Sasaki, Y., Akiyoshi, K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *The Chemical Record* **2010**; 10, 366-376.
- Sáez, V., Hernández, E., Sanz, A. L., Katime, Issa, Liberación controlada fármacos. *Revista iberoamericana de Polímeros*. **2004**; Vol. 5
- Serrano-Medina, A., Cornejo-Bravo, J. M., Licea-Caveríe, A. Synthesis of pH and temperatura sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**; 369, 82-90.
- Steiniger, S.C.J., Kreuter, L., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Borruskin, A.I., Smirnova, Z.S., Severin, S.E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K.D. y Gelperina, S. E. Chemotherapy of Glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer* **2004**; 109, 759-767.
- Soo, P. L., Dunne, M., Liue, J., Allen, C. Biotechnology: Pharmaceuticals aspects. nanotechnology in drug delivery. Chapter 12: Nano-sized advance drug delivery systems as parental formulation strategies for hydrophobic anti-cancer drugs. Springer **2009**; New York, USA. 349-383.
- Tanaka, T. *Phase Transition of Gels*. A. C. S. Symposium Series, Capitulo 1, "Polyelectrolyte Gels". American Chemical Society. **1992**; 480, 1-21.
- Tran, P.A., Zhang, L. y Webster, T. J. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**; 61, 1097-1114.
- Vinogradov, S. V., Bronich, T. K., Kabanov, A. V. Nanosized cationic hydrogel for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**; 54, 135-147.
- Vinogradov, S., Kabanov, A.V. Poly(ethylene glycol)–polyethylenimine NanoGel particles: novel drug delivery systems for antisense oligonucleotides. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **1999**; 16, 291–304.
- Wadajkar, A. S., Koppolu, B., Rahimi, M., Nguyen, K. T. Cytotoxic evaluation of *N*-isopropylacrylamide monomers and temperature-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) nanoparticles. *J. Nanopart Res* **2009**; 11, 1375-1382.

- Wetering, P., Cherng, J.Y., Talsma, H., Crommelin, D.J.A., y Hennink, W. E. 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co) polymers as gene transfer agents. *Journal of Controlled Release* **1998**; 53, 145-153.
- Wong, L. H., Rauth, M. A., Bendayan, R., Manias, L. J., Ramaswamy, M., Liu, Z., Erhan, Z. S., Wu, Y. X., A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrugoresistant human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research* **2006**; 23 (7), 1574-1585.
- Xiong, D., He, Z., An, Y., Li, Z., Wang, H., Chen, X., Shi, L. Temperature-responsive multilayered micelles formed from the complexation of PNIPAM-*b*-P4VP block-copolymer and PS-*b*-PAA core-shell micelles. *Polymer* **2008**; 49, 2548-2552.
- Yan, L. y Tao, W. One step synthesis of pegylated cationic nanogels of poly(*N-N'*-dimethylaminoethyl methacrylate) in aqueous solution via self-stabilizing micelles using an amphiphilic macroRAFT agent. *Polymer* **2010**; vol 51. Pp. 2161-2167.
- Young, R.J., Lovell, P.A. *Introduction to polymers*. **2011**; 3ra. Edición, Taylor & Francis Group, LLC. FI. USA. Pp.61.
- Zhang, L., Bernard, J., Davis, T.P., Barner-Kowollik, C., Stenzel, M.H. Acid-degradable core-crosslinked micelles prepared from thermosensitive glycopolymers synthesized via RAFT polymerization. *Macromol. Rapid Commun* **2008**; 29, 123-129.
- Zhang, L., Song, J., Newhouse, Y., Zhang, S., Weisgraber, K.H., Ren, G., An optimized negative-staining protocol of electron microscopy for apoE4.POPC lipoprotein. *Journal of Lipid Research*. **2010**; 51, 1228-1236.
- Zhao, Y., Zheng, C., Wang, Q., Fang, J., Zhou, G., Zhao, H., Yang, Y., Xu, H., Feng, G., Yang, X. Permanent and peripheral embolization: temperature-sensitive p(*N*-isopropylacrylamide-co-butyl methylacrylate) nanogel as a novel blood-vessel-embolic material in the interventional therapy of liver tumors. *Adv. Funt. Mater.* **2011**; 21, 2035-2042.

### 6.2 Cibercitas

- a. <http://www.wako-chem.co.jp/specialty/waterazo/V-50.htm> (acesado el 6 de abril del 2013)
- b. [http://www.wakousa.com/specialty/specialty\\_focus.html](http://www.wakousa.com/specialty/specialty_focus.html) (acesado 4/6/2013)
- c. <http://www.wonilchem.co.kr/AzoPresentation.files/frame.htm#slide0016.htm> (acesado 4/6/2013) diapositiva 56
- d. <http://datasheets.scbt.com/sc-202946.pdf> (acesado 4/6/2013)
- e. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/polymer-science/free-radical-initiators.html> (acesado 4/6/2013)

## Referencias

---

- f. [[http://asplib.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule\\_BasicTheoryAFM.pdf](http://asplib.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule_BasicTheoryAFM.pdf)] Ref. Wilson, R.A. (acesado 3/16/2013)
- g. [<http://em-outreach.ucsd.edu/web-course/toc.html>] Ref. Facultad de Física, Universidad de la Habana (acesado 3/05/2013)

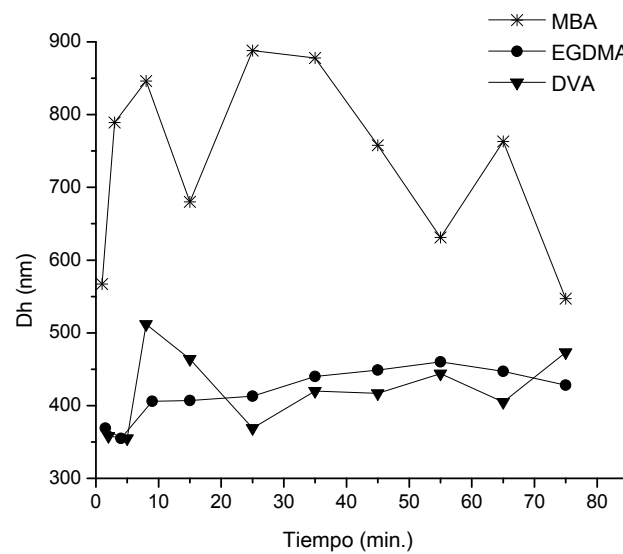
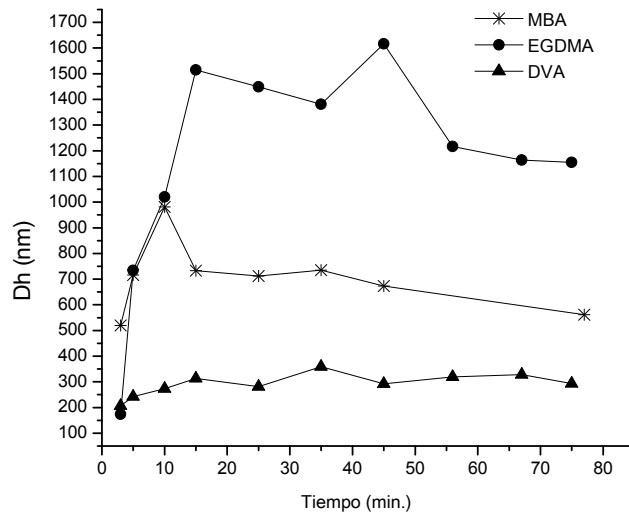
**CAPÍTULO VII. ANEXOS**

**ANEXO 7.1** Tamaño hidrodinámico medido por intensidad y PDI (DLS). Las reacciones contienen NIPAAm/Entrecruzante/Iniciador se empleó la técnica de síntesis de polimerización por dispersión.

No. reacción	Entrecruzante	Iniciador	D <sub>h</sub> (nm)	(PDI)
1	DVA 1%	APS 2%	457	0.056
2	DVA 2%	APS 2%	375	0.133
3	DVA 3%	APS 2%	341	0.100
4	DVA 4%	APS 2%	323	0.128
5	DVA 5%	APS 2%	292	0.008
6	DVA 1%	APS 4%	521	0.168
7	DVA 2%	APS 4%	465	0.102
8	DVA 3%	APS 4%	460	0.172
9	DVA 4%	APS 4%	359	0.217
10	<b>DVA 5%</b>	<b>APS 4%</b>	<b>351</b>	<b>0.144</b>
11	MBA 1%	APS 2%	55*	0.434
12	MBA 2%	APS 2%	745*	0.417
13	MBA 3%	APS 2%	669	0.272
14	MBA 4%	APS 2%	493	0.016
15	MBA 5%	APS 2%	528	0.051
16	MBA 1%	APS 4%	317*	0.756
17	MBA 2%	APS 4%	487*	0.805
18	MBA 3%	APS 4%	836*	0.307
19	MBA 4%	APS 4%	727	0.219
20	<b>MBA 5%</b>	<b>APS 4%</b>	<b>630</b>	<b>0.058</b>
21	EGDMA 1%	APS 2%	582	0.134
22	EGDMA 2%	APS 2%	540	0.154
23	EGDMA 3%	APS 2%	518	0.051
24	EGDMA 4%	APS 2%	518	0.091
25	EGDMA 5%	APS 2%	657	0.067
26	EGDMA 1%	APS 4%	855*	0.299
27	EGDMA 2%	APS 4%	604	0.174
28	EGDMA 3%	APS 4%	578	0.167
29	EGDMA 4%	APS 4%	510	0.123
30	<b>EGDMA 5%</b>	<b>APS 4%</b>	<b>410</b>	<b>0.065</b>

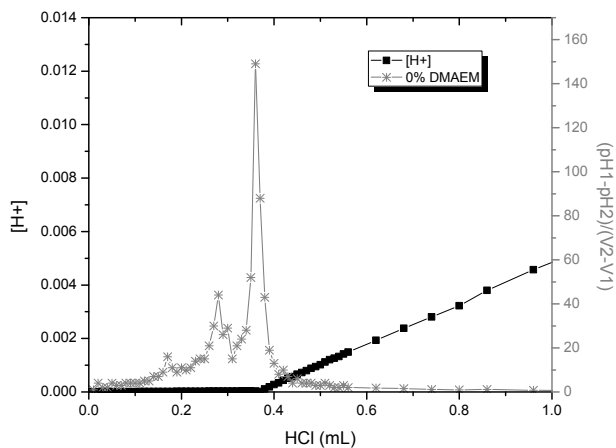
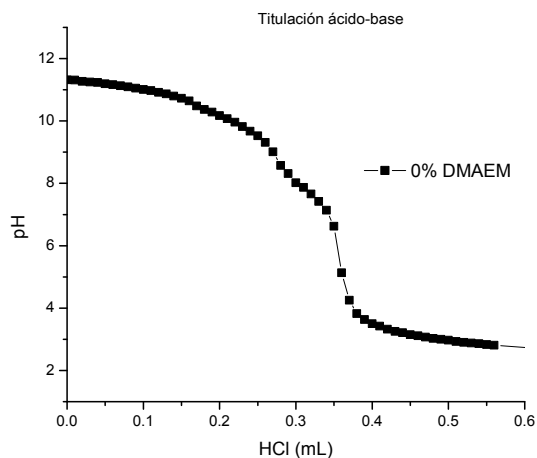
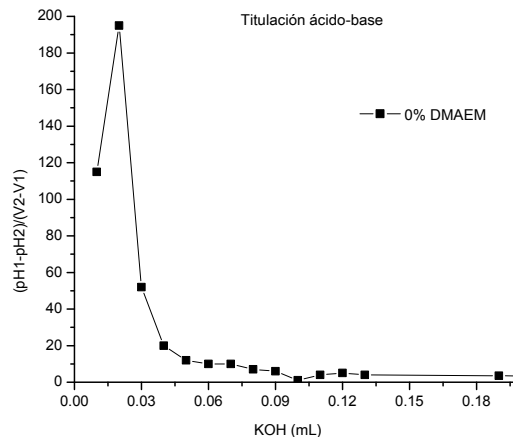
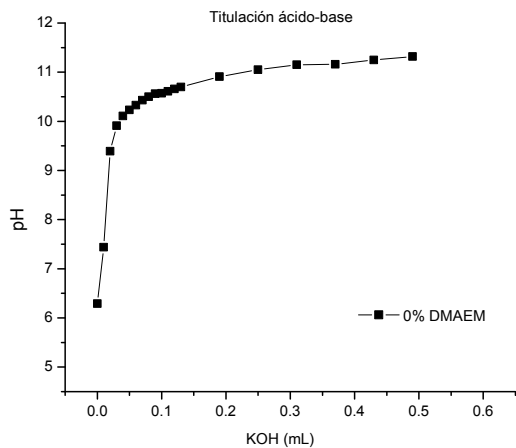
NOTA: Las reacciones se llevaron a cabo por 45 min, excepto en la número 1 y 16, las cuales fueron muestreadas durante la reacción que duró 75 minutos. (\* Más de una distribución.)

**ANEXO 7.2** Tamaño del diámetro hidrodinámico por intensidad de las partículas durante el proceso de polimerización contra el tiempo. Gráfica superior con APS 2.0%, y gráfica inferior APS 4.0%

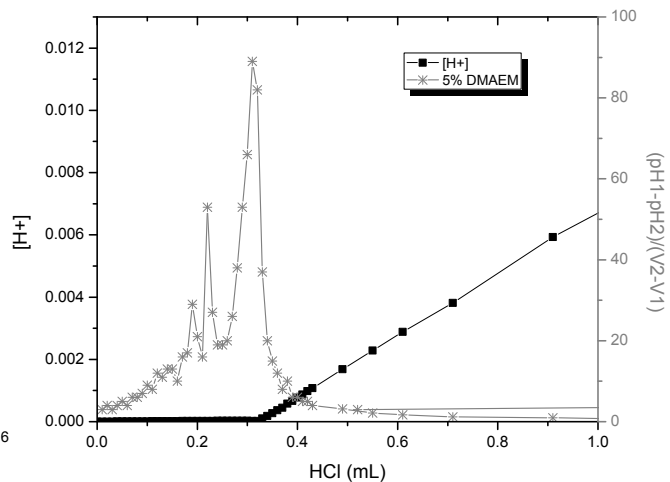
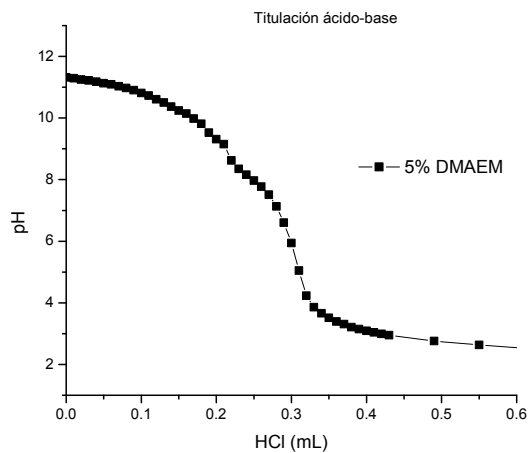
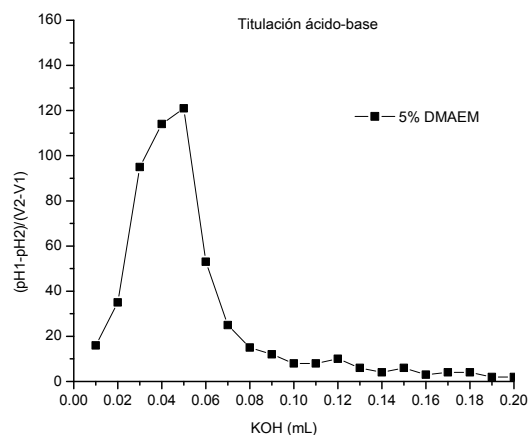
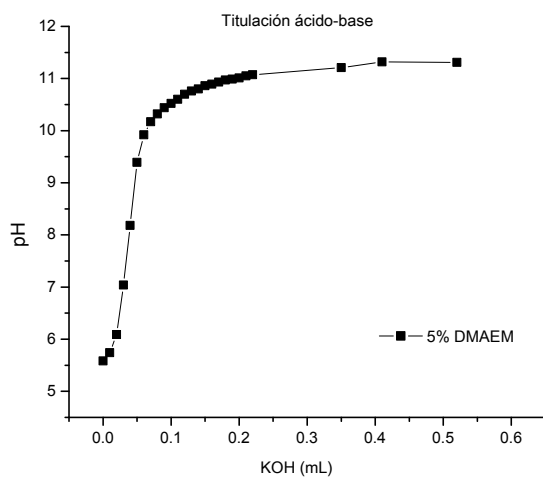


Nota: reacciones a partir de NIPAAm, entrecruzante 5.0% de moles de NIPAAm / APS.

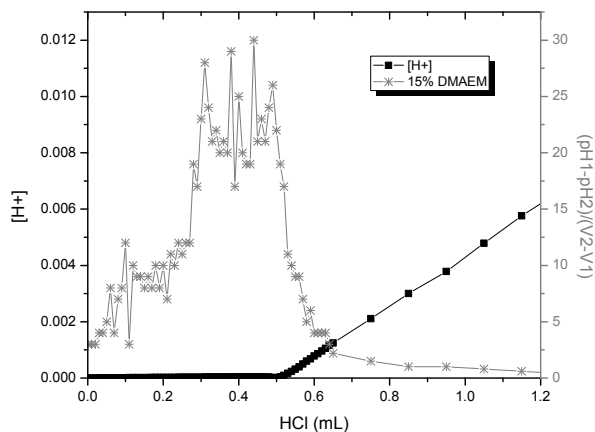
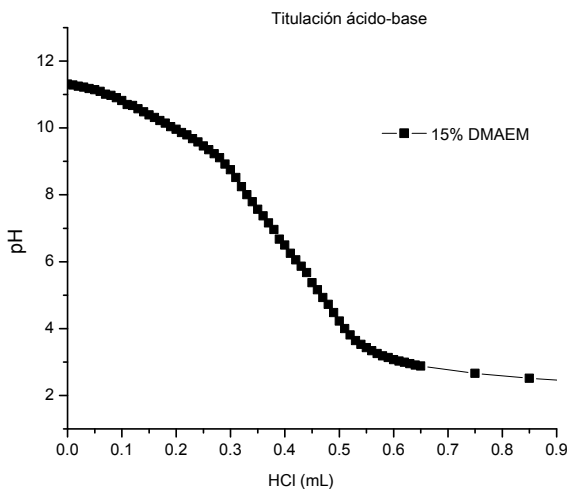
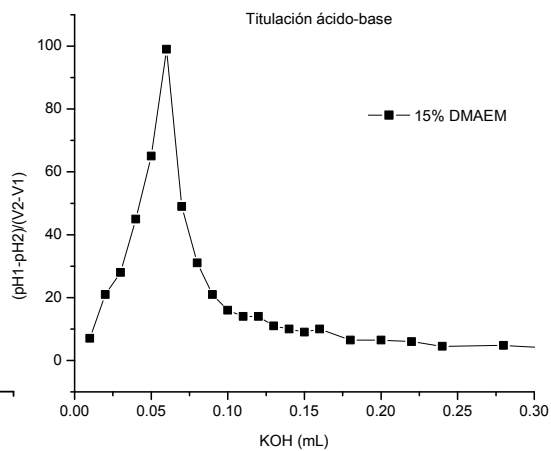
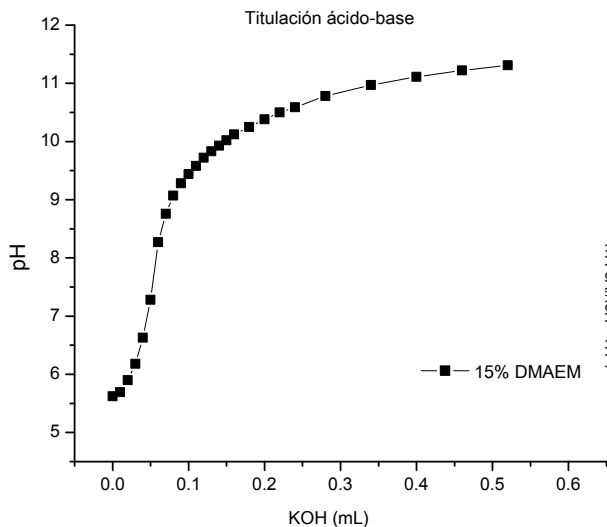
**ANEXO 7.3 a.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, y AIBA 2.0%.



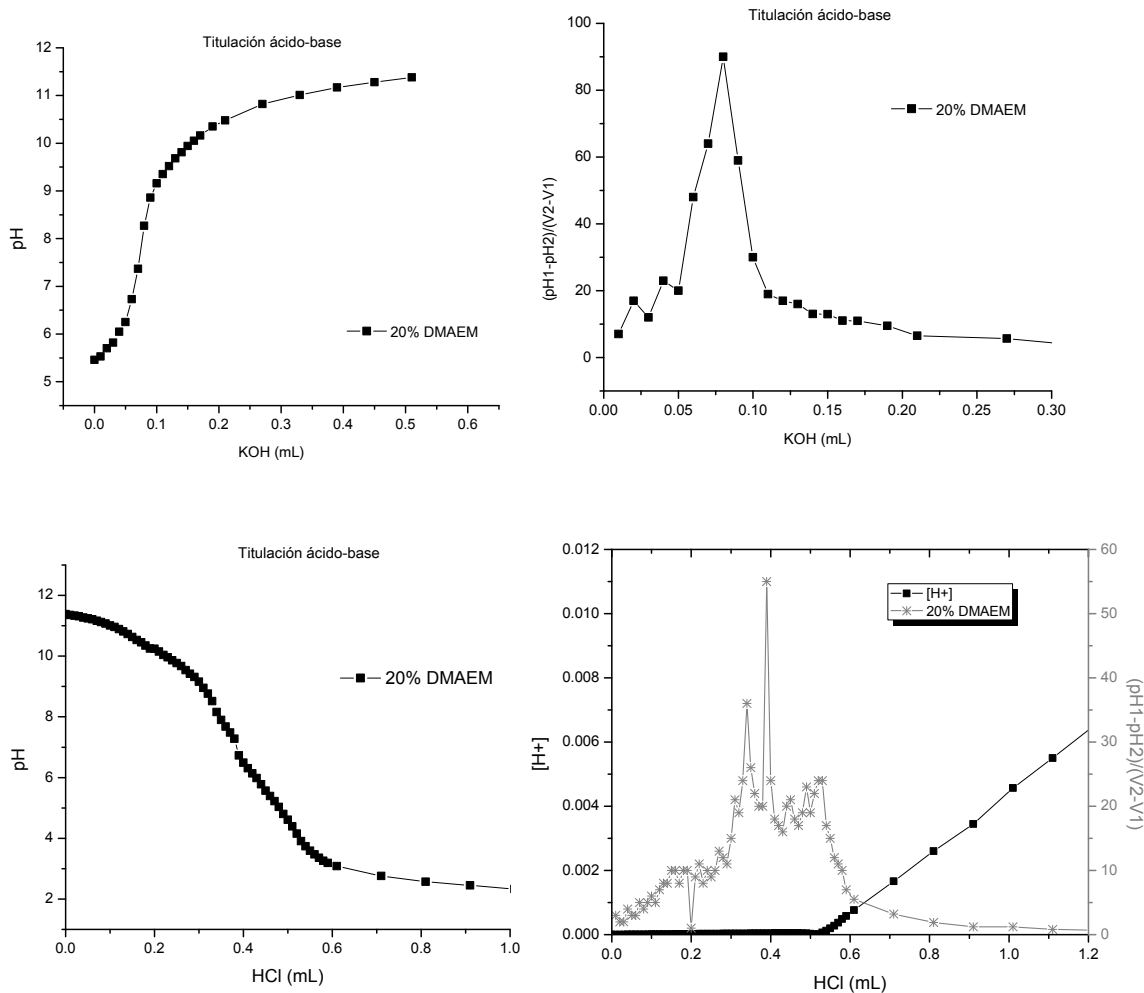
**ANEXO 7.3 b.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%, y DMAEM 5.0%.



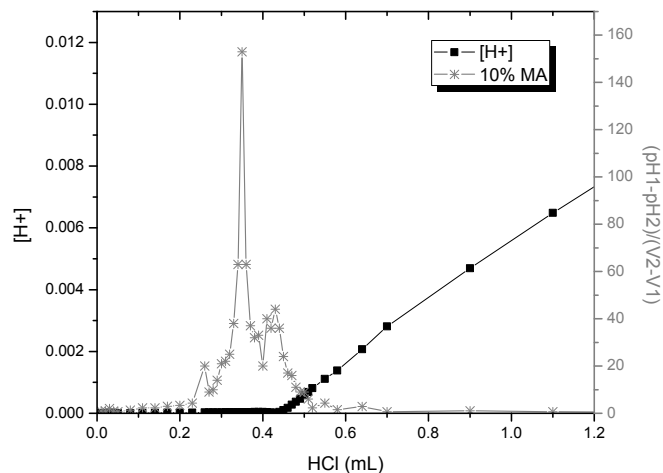
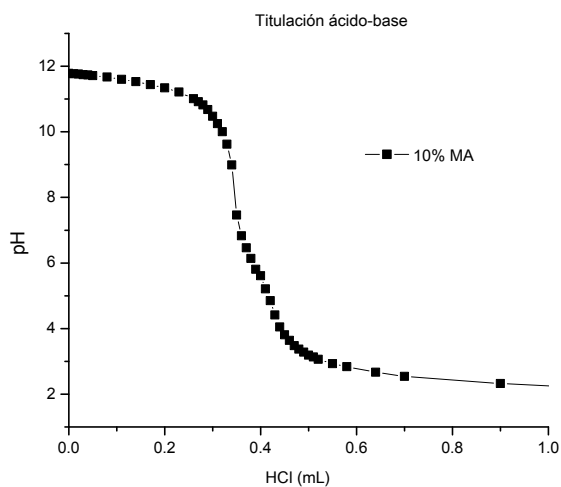
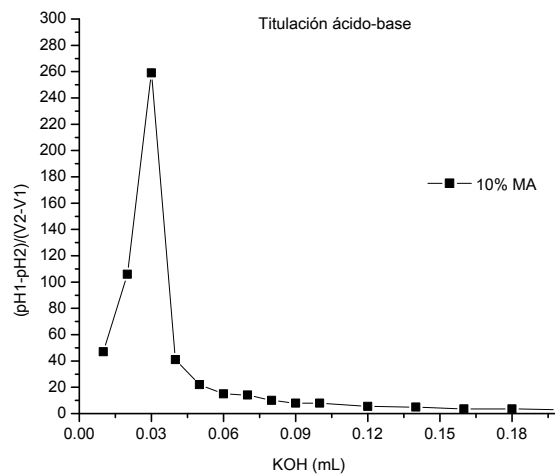
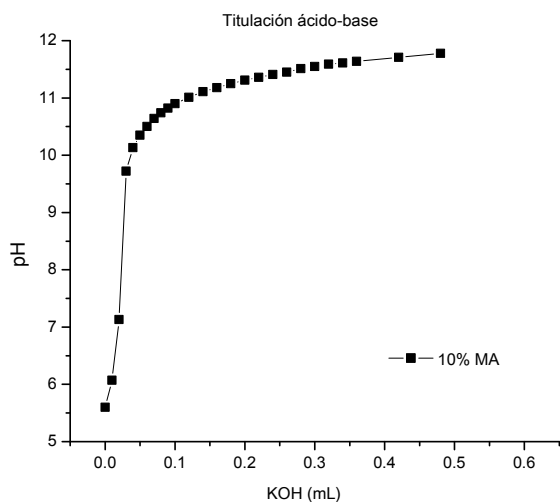
**ANEXO 7.3 c.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%, y DMAEM 15.0%.



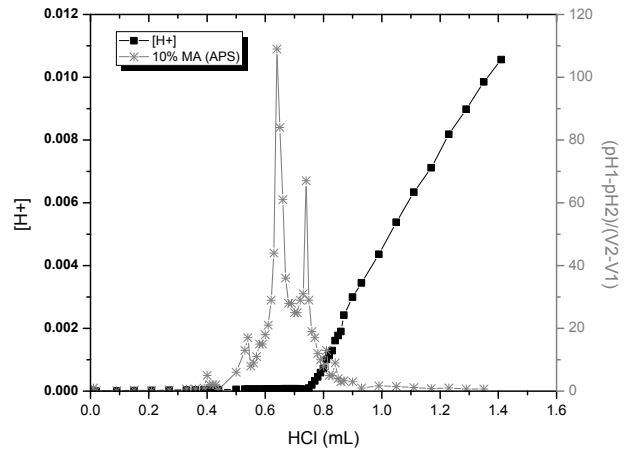
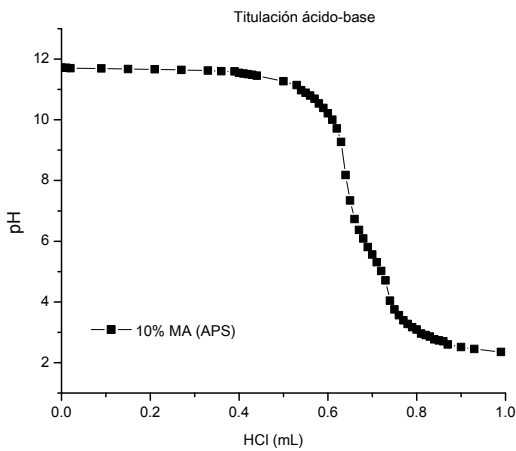
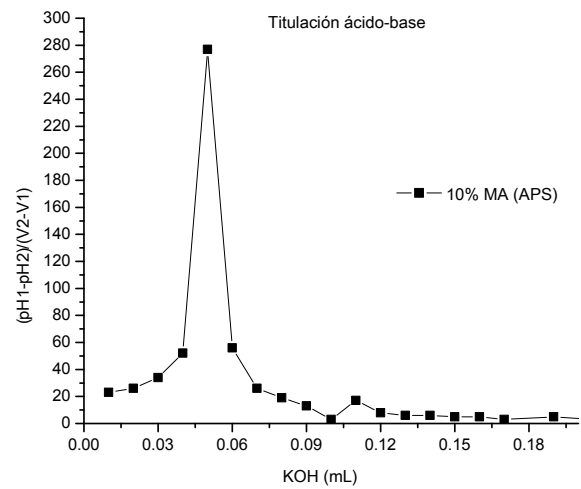
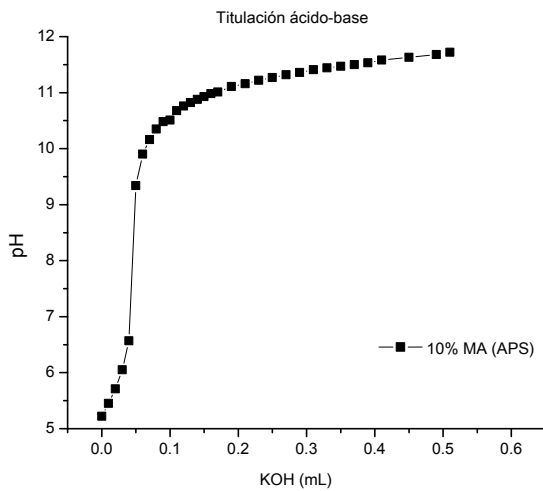
**ANEXO 7.3 d.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%, y DMAEM 20.0%.



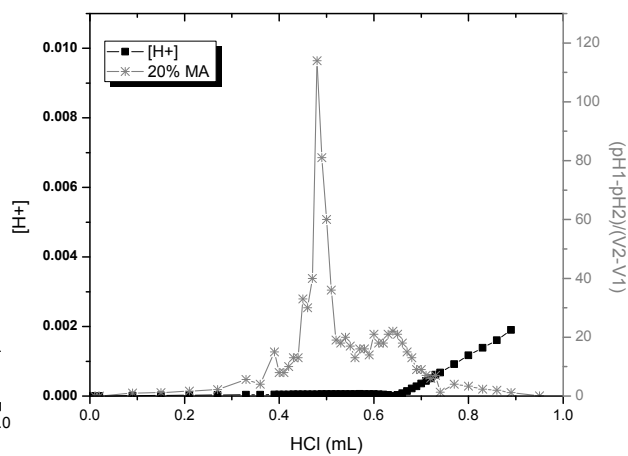
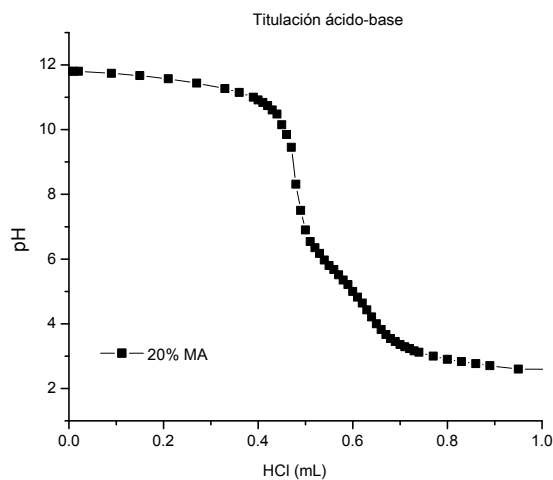
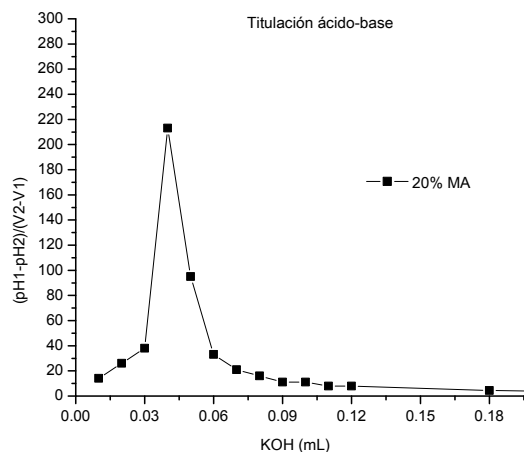
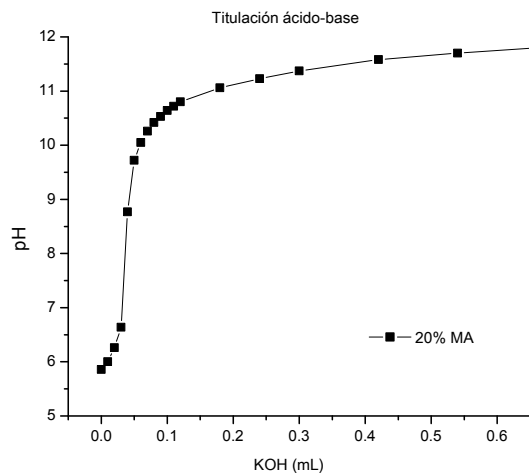
**ANEXO 7.4 a.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%, y MA 10.0%,



**ANEXO 7.4 b.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, APS 2.0%, y MA 10.0%.



**ANEXO 7.4 c.** Curva de titulación de nano/microgeles, primer titulante: KOH (grafica superior), segundo titulante: HCl (grafica inferior) y sus respectivas curvas de la derivada del pH (graficas a la derecha). NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%, y MA 20.0%.



**ANEXO 7.5** Cálculos para obtener el % del ácido metacrílico (MA) producido por la hidrólisis del DMAEM.

- Ecuación 1. Cantidad (mg) del MA calculado por medio de la titulación

$$\text{ácido calculado (mg)} = a \times b \times c$$

$a = PM_{(\text{del ácido})}$   
 $b = \text{concentración del titulante}$   
 $c = \text{mL gastado del titulante}$

- Ecuación 2. Porcentaje (w/w) del MA calculado:

$$\% \text{ (w/w) ácido calculado} = \frac{\text{peso del ácido calculado}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

**DATOS:**

DMAEM <sup>a</sup> (%)	KOH (mL)	MA calculado (mg)	muestra (mg)	MA calculado (% <sub>w/w</sub> )
0	0.02	N/A	20.2	N/A
5	0.05	0.36	14.4	2.5
15	0.06	0.44	15.1	2.91
20	0.08	0.58	14.3	4.05

<sup>a</sup> (en base a los moles de NIPAAm)

Nota: nano/microgeles NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%

**ANEXO 7.6** Cálculos para obtener el % del ácido metacrílico (MA) incorporado en los nano/microgeles sintetizados con MA.

- Ecuación 3. Porcentaje (w/w) del MA esperado (en la síntesis)

$$\% \text{ (w/w) ácido esperado} = \frac{\text{cantidad de ácido pesado}}{\text{cantidad sólidos totales (S.T.) pesado}} \times 100$$

- Cantidad (mg) de MA calculado por medio de la titulación: (Ecuación 1)
- Ecuación 4. Cantidad (mg) de MA esperado.

$$\text{ácido esperado} = \frac{\text{peso de la muestra} \times (\% \text{ de ácido esperado})}{100}$$

- Porcentaje (w/w) de MA calculado: (Ecuación 2)
- Ecuación 5. Porcentaje del MA incorporado:

$$\% \text{ ácido incorporado} = \frac{\text{peso del ácido calculado}}{\text{peso del ácido esperado}} \times 100$$

**DATOS:**

nano/ microgel	MA <sup>a</sup> (%)	S.T. en la rx (g)	MA en la rx (g)	KOH (mL)	muestra (mg)	MA calculado (mg)	MA esperado (mg)
AIBA	10	0.5738	0.0263	0.03	10.2	0.22	0.46
AIBA	20	0.5949	0.0547	0.04	13.4	0.29	1.23
APS	10	0.56649	0.0309	0.05	13.4	0.36	0.73

<sup>a</sup> (en base a los moles de NIPAAm), se empleó KOH 0.0848 N como titulante.  
rx= reacción

**ANEXO 7.7** Cálculos para obtener el % (w/w) del compuesto básico (DMAEM) y del iniciador AIBA, incorporado en los nano/microgeles.

- Ecuación 6. Peso del iniciador AIBA ajustado:

$$\text{Peso AIBA ajustado} = \frac{[PM_{\text{AIBA}} - PM_{\text{N}_2}]}{PM_{\text{AIBA}}} \times \text{cantidad de AIBA pesada}$$

- Ecuación 7. Peso de los reactivos ajustado:

$$\text{Cantidad de reactivos (S.T.) ajustada} = a - [b - c]$$

a = cantidad sólidos totales pesados  
 b = cantidad de AIBA pesado  
 c = Peso del AIBA ajustado

- Ecuación 8. Porcentaje del AIBA esperado:

$$\% \text{ AIBA esperado} = \frac{\text{Peso del AIBA ajustado}}{\text{cantidad de reactivos (S.T.) ajustada}} \times 100$$

- Ecuación 9. Cantidad de AIBA obtenido por medio de la titulación

$$\text{AIBA calculado (mg)} = a \times b \times c$$

a = PM AIBA<sub>radical</sub> (121.595 g/mol)  
 b = concentración del titulante  
 c = mL gastado del titulante

- Ecuación 10. Porcentaje (w/w) de AIBA:

$$\% \text{ (w/w) AIBA calculada} = \frac{\text{AIBA calculado}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

- Ecuación 11. Cantidad (mg) de AIBA calculado<sup>2</sup> obtenido por medio de la titulación (para las muestras con DMAEM)

$$\% \text{ AIBA calculada}^2 = \frac{\%_{\text{w/w}} \text{ de AIBA calculada}}{100} \times \text{peso de la muestra}$$

- Ecuación 12. Cantidad (mg) de DMAEM calculado

$$\text{DMAEM calculado} = a - b$$

$$a = \text{AIBA calculado}$$

$$b = \text{AIBA calculado}^2$$

- Ecuación 13. Porcentaje de DMAEM esperado

$$\% \text{ (w/w) DMAEM esperado} = \frac{\text{cantidad de DMAEM pesado}}{\text{cantidad sólidos totales ajustados}} \times 100$$

- Ecuación 14. Porcentaje de DMAEM calculado

$$\% \text{ (w/w) DMAEM calculada} = \frac{\text{cantidad DMAEM calculado}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

- Ecuación 15. Cantidad (mg) DMAEM esperado

$$\text{DMAEM esperado} = \frac{\%_{(w/w)} \text{DMAEM esperado}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

- Ecuación 16. Porcentaje del DMAEM incorporado:

$$\% \text{ DMAEM incorporado} = \frac{\text{DMAEM calculado}}{\text{DMAEM esperado}} \times 100$$

**DATOS:**

DMAEM <sup>a</sup> (%)	AIBA en la rx (g)	S.T. en la rx (g)	AIBA ajustado (g)	S.T. ajustado (g)	AIBA esperado (%)
0	0.0167	0.5331	0.0149	0.5313	2.82
5	0.0179	0.5757	0.0160	0.5738	2.79
15	0.017	0.6362	0.0152	0.6344	2.40
20	0.0169	0.6337	0.0151	0.6319	2.39

**DATOS (continuación):**

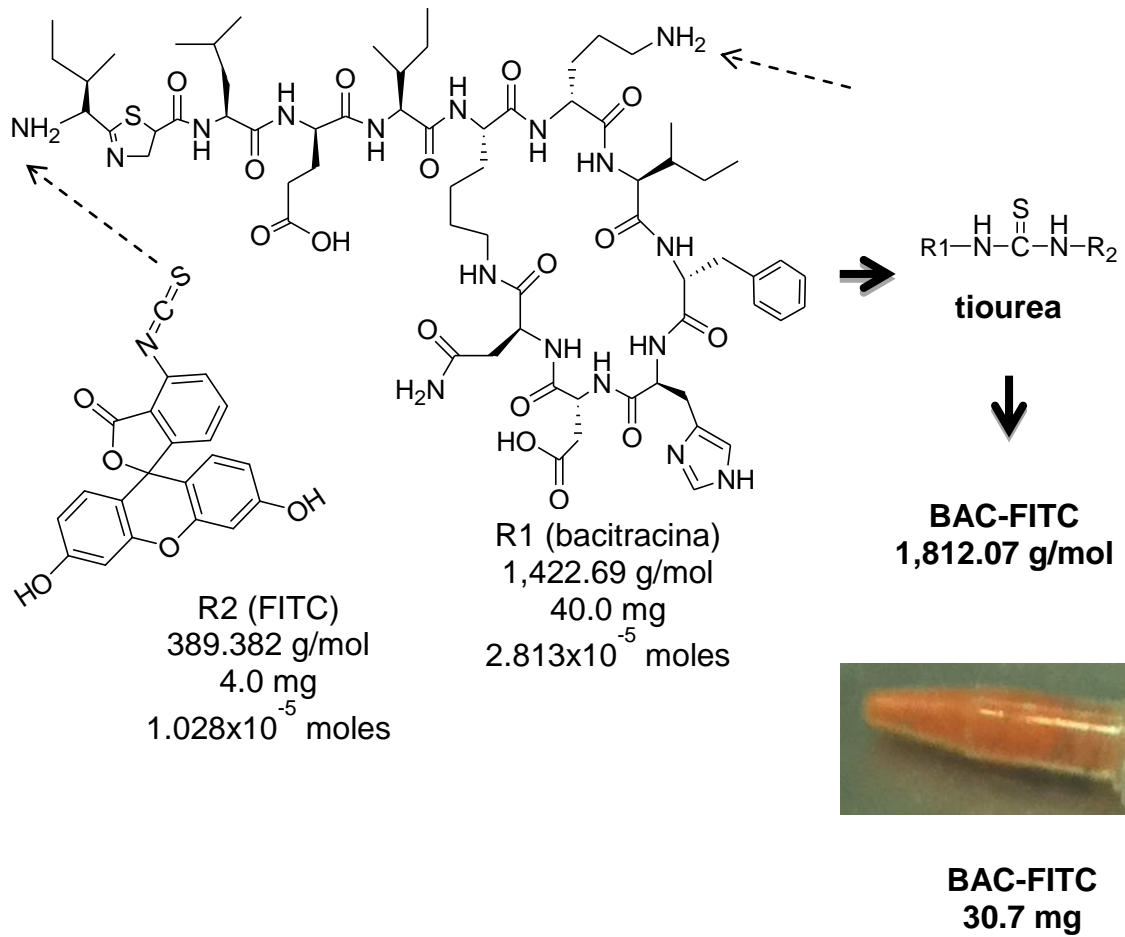
DMAEM <sup>a</sup> (%)	HCl (mL)	AIBA calculado (mg)	muestra (mg)	AIBA calculado <sup>2</sup> (mg)	DMAEM en la rx (mg)	DMAEM esperado (mg)	DMAEM calculado (mg) (Ec.12)
0	0.08	1.024	20.2		0	0	N/A
		DMAEM + AIBA calculado (mg)					
5	0.09	1.15	14.4	0.73	26.2	0.65	0.42
15	0.18	2.30	15.1	0.76	79.4	1.89	1.54
20	0.2	2.56	14.3	0.73	97.2	2.20	1.83

<sup>a</sup> (en base a los moles de NIPAAm)

rx = reacción; Ec. = ecuación

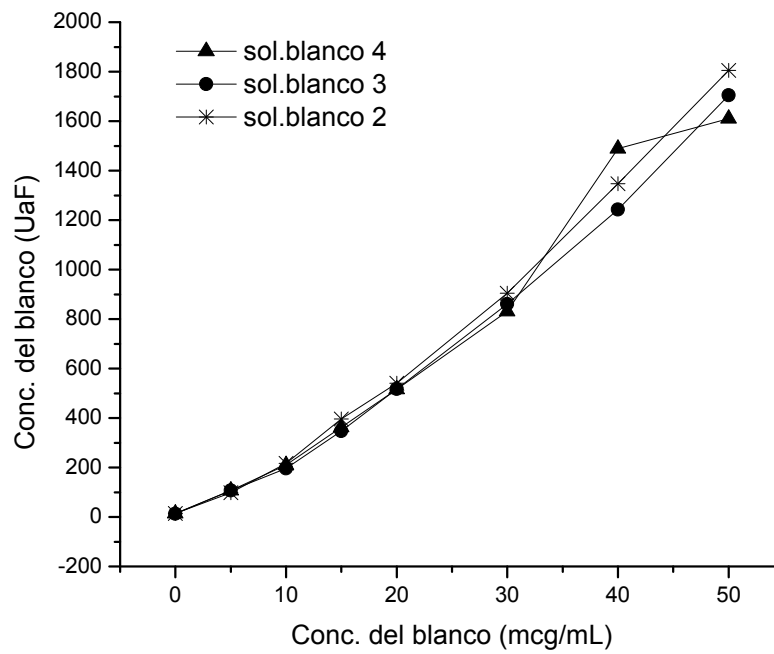
Nota: nano/microgeles NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>, DVA 2.5%, AIBA 2.0%

**ANEXO 7.8** Bacitracina marcada con FITC.



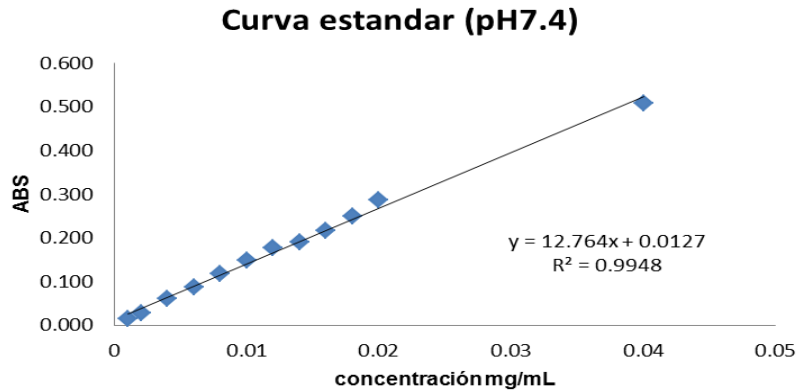
**ANEXO 7.9** Curva de calibración de la BAC-FITC. (fluorómetro)

Curva de calibración de la bacitracina marcada con FITC.



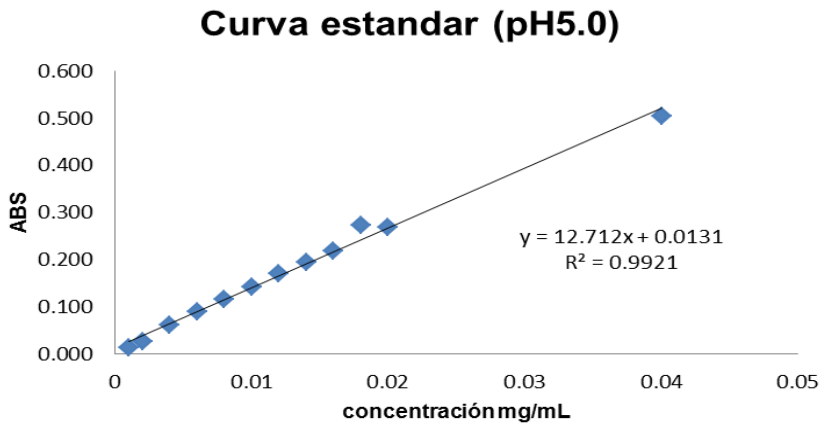
**ANEXO 7.10** Curva estándar a pH7.4 para las liberaciones con vitamina B12.

Concentración mg/mL	ABS Prom.
0.001	0.014
0.002	0.027
0.004	0.060
0.006	0.086
0.008	0.118
0.01	0.148
0.012	0.176
0.014	0.189
0.016	0.217
0.018	0.249
0.02	0.286
0.04	0.508



**ANEXO 7.11** Curva estándar a pH5.0 para las liberaciones con vitamina B12.

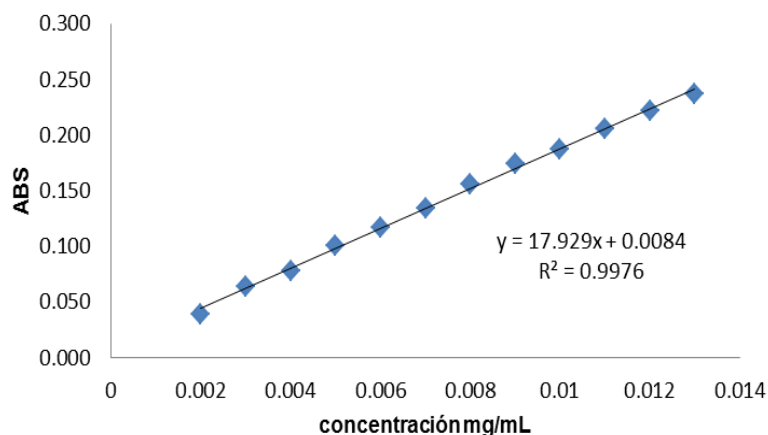
Concentración mg/mL	ABS Prom.
0.001	0.013
0.002	0.027
0.004	0.061
0.006	0.090
0.008	0.116
0.01	0.141
0.012	0.171
0.014	0.193
0.016	0.218
0.018	0.273
0.02	0.269
0.04	0.504



**ANEXO 7.12** Curva estándar para cuantificar el cargado con vitamina B12 (DMA:agua 1:1)

Concentración mg/mL	ABS Prom.
0.002	0.039
0.003	0.064
0.004	0.078
0.005	0.100
0.006	0.117
0.007	0.134
0.008	0.156
0.009	0.174
0.01	0.187
0.011	0.206
0.012	0.222
0.013	0.237

**Curva estandar en DMA:H<sub>2</sub>O**



**ANEXO 7.13** Fórmula del % de cargado y de eficiencia

**Porcentaje de Carga**

$$\% \text{ Carga} = \frac{W_{\text{mg de vit B12}}}{W_{\text{mg de los nanogeles cargados}}} \times 100$$

$$\% \text{ Carga} = \frac{0.039}{1.6} \times 100 \quad (\text{ejemplo})$$

**Eficiencia**

$$\% \text{ Eficiencia}^1 = \frac{(\text{carga}) (W_{\text{mg nanogeles cargados}})}{W_{\text{mg del fármaco adicionado}}} \times 100$$

$$\% \text{ Eficiencia}^1 = \frac{(0.025) (44.8)}{8.3} \times 100 = 13.49 \% \quad (\text{ejemplo})$$

$$\% \text{ Eficiencia}^2 = \frac{(\text{mg de VitB12 liberada})}{(W_{\text{mg nanogeles cargados}} - \text{mg de VitB12 liberada})} \times 100 =$$

**ANEXO 7.14** Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12.

<b>Nanogeles DVA/DMAEM pH 7.4 a 37°C</b>						
Tiempo (h)	ABS	Conc. mg/mL	W (mg) (1mL) alícuota	W (mg) (100mL) medio	W (mg) extraído	Fracc. libre
	Lectura	$X = \text{ABS} - b/m$	$(x^*1)$	$(x^*1^*100)$	$(x^*1^*100) + \Sigma (x^*1)$	$W_{\text{extraído}} / \text{Vit. B12 cargado}$
1.5	0.002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.5	0.014	0.0001	0.0001	0.0102	0.0102	0.0394
3.5	0.018	0.0004	0.0004	0.0415	0.0416	0.1611
4.5	0.017	0.0003	0.0003	0.0337	0.0341	0.1320*
5.5	0.024	0.0009	0.0009	0.0885	0.0889	0.3439
12.5	0.029	0.0013	0.0013	0.1277	0.1286	0.4976
18.5	0.035	0.0017	0.0017	0.1747	0.1760	0.6811
21.5	0.036	0.0018	0.0018	0.1825	0.1843	0.7132
24.25	0.037	0.0019	0.0019	0.1904	0.1922	0.7438
37.5	0.043	0.0024	0.0024	0.2374	0.2393	0.9260
44	0.043	0.0024	0.0024	0.2374	0.2398	0.9279

NOTA: (\*) eliminado en la gráfica.

**ANEXO 7.15** Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12.

<b>Nanogeles DVA/DMAEM pH 7.4 a 42°C</b>						
Tiempo (h)	ABS	Conc. mg/mL	W (mg) (1mL) alícuota	W (mg) (100mL) medio	W (mg) extraído	Fracc. libre
	Lectura	$X = \text{ABS} - b/m$	$(x^*1)$	$(x^*1^*100)$	$(x^*1^*100) + \Sigma (x^*1)$	$W_{\text{extraído}} / \text{Vit. B12 cargado}$
1.5	0.011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.5	0.018	0.0004	0.0004	0.0415	0.0415	0.3141
3.5	0.021	0.0007	0.0007	0.0650	0.0654	0.4950
4.5	0.021	0.0007	0.0007	0.0650	0.0657	0.4968
5.5	0.024	0.0009	0.0009	0.0885	0.0892	0.6746
10.5	0.026	0.0010	0.0010	0.1042	0.1051	0.7949
25	0.031	0.0014	0.0014	0.1434	0.1444	1.0924 *
32	0.027	0.0011	0.0011	0.1120	0.1135	0.8583*
44	0.026	0.0010	0.0010	0.1042	0.1053	0.7967
55	0.024	0.0009	0.0009	0.0885	0.0896	0.6776*

NOTA: (\*) eliminado en la gráfica.

**ANEXO 7.16** Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12.

<b>Nanogeles DVA/DMAEM pH 5.0 a 37°C</b>						
Tiempo (h)	ABS	Conc. mg/mL	W (mg) (1mL) alícuota	W (mg) (100mL) medio	W (mg) extraído	Fracc. libre
	Lectura	X= ABS-b/m	(x*1)	(x*1*100)	(x*1*100) + $\Sigma$ (x*1)	Wextraído/ Vit. B12 cargado
2.5	0.013	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3.5	0.016	0.0002	0.0002	0.0228	0.0228	0.2099
4.5	0.018	0.0004	0.0004	0.0385	0.0388	0.3570
5.5	0.018	0.0004	0.0004	0.0385	0.0389	0.3584
7.5	0.023	0.0008	0.0008	0.0779	0.0783	0.7206
19.5	0.027	0.0011	0.0011	0.1093	0.1101	1.014*
23.5	0.024	0.0009	0.0009	0.0857	0.0868	0.7996
29.5	0.026	0.0010	0.0010	0.1015	0.1023	0.9423*
42.75	0.025	0.0009	0.0009	0.0936	0.0946	0.8713
47	0.024	0.0009	0.0009	0.0857	0.0867	0.7981*

NOTA: (\*) eliminado en la gráfica.

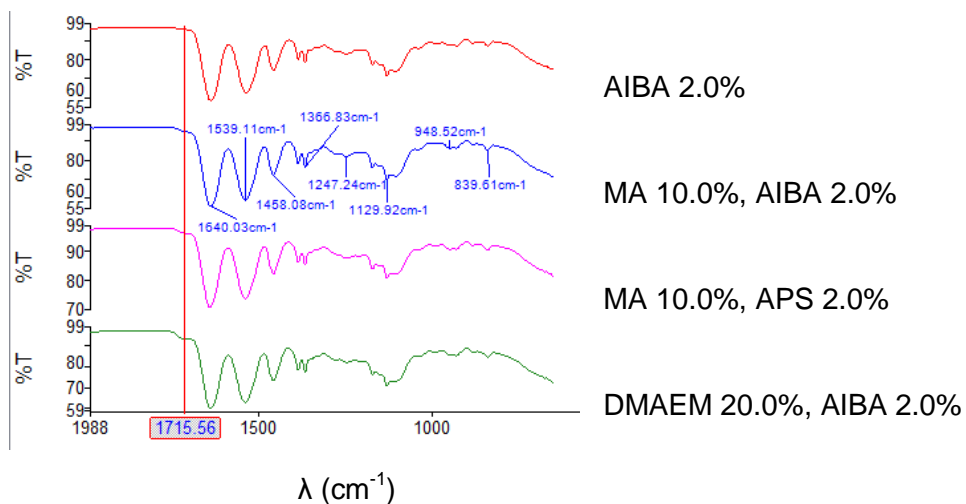
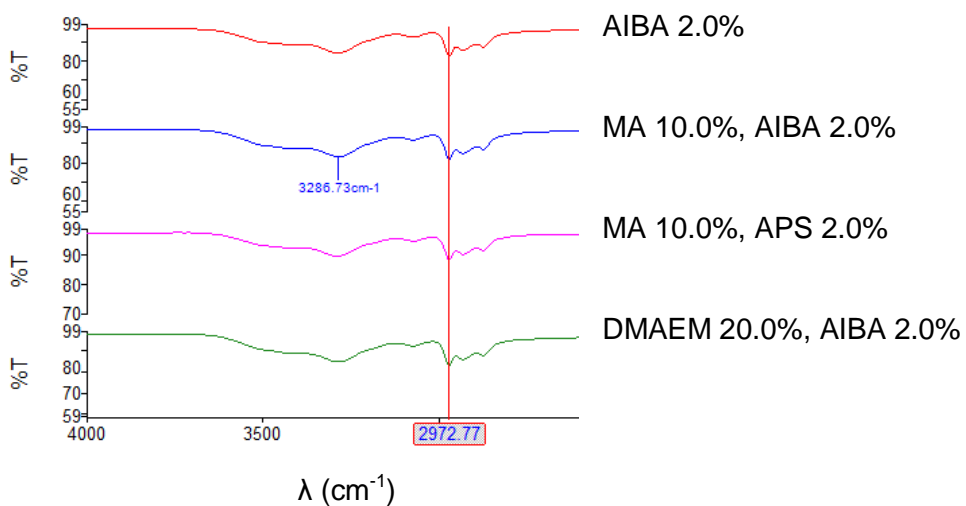
**ANEXO 7.17** Análisis para cuantificar la liberación de la vitamina B12.

<b>Nanogeles DVA/DMAEM pH 5.0 a 42°C</b>						
Tiempo (h)	ABS	Conc. mg/mL	W (mg) (1mL) alícuota	W (mg) (100mL) medio	W (mg) extraído	Fracc. libre
	Lectura	X= ABS-b/m	(x*1)	(x*1*100)	(x*1*100) + $\Sigma$ (x*1)	Wextraído/ Vit. B12 cargado
1.5	0.009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.5	0.014	0.0001	0.0001	0.0071	0.0071	0.0402
3.5	0.014	0.0001	0.0001	0.0071	0.0072	0.0406
4.5	0.016	0.0002	0.0002	0.0228	0.0229	0.1300
5.5	0.018	0.0004	0.0004	0.0385	0.0388	0.2203
19	0.026	0.0010	0.0010	0.1015	0.1019	0.5788
32	0.026	0.0010	0.0010	0.1015	0.1025	0.5824
44	0.024	0.0009	0.0009	0.0857	0.0868	0.4930*
55	0.033	0.0016	0.0016	0.1565	0.1574	0.8943

NOTA: (\*) eliminado en la gráfica.

**ANEXO 7.18** Espectro de FT-IR de los nano/microgeles

Modificaciones:



NOTA: La síntesis de estos nano/microgeles se llevó a cabo a partir de: NIPAAm/PEGMA<sub>2080</sub>/DVA 2.5% con las modificaciones mencionadas arriba. Las señales más importantes están a 1640  $\text{cm}^{-1}$  (para la amida de la NIPAAm) y a 1715 se encuentra el éster (DMAEM)