

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



"Síntesis de nanogeles biocompatibles, con núcleo catiónico sensible al medio ambiente y su aplicación como sistemas de liberación de fármacos"

TRABAJO DE TESIS

Presentado por

QFB. Rafael Alejandro Castro Marín

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Co-Director de tesis

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 213

Tijuana, B. C., a 7 de junio de 2017

C. Rafael Alejandro Castro Marín
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

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

Es propuesto, por los C. Dres. José Manuel Cornejo Bravo y Aracely Serrano
Medina

Quiénes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente,
referido al tema “Síntesis de nanogeles biocompatibles, con núcleo catiónico
sensible al medio ambiente y su aplicación como sistemas de liberación de
fármacos”

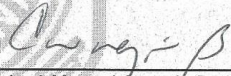
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:


- I.- INTRODUCCION
- II.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS
- III.- ANTECEDENTES
- IV.- EXPERIMENTAL
- V.- RESULTADOS Y DISCUSION
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- BIBLIOGRAFIA
- VIII.- ANEXOS


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Secretario


Dra. Aracely Serrano Medina
Co-Directora de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Dedicatoria

Este trabajo tan emocionante va dedicado primeramente a mis padres Javier y Francisca ya que gracias a ellos soy alguien en este momento, a mis hermanos Francisco, Isis, Rosalía, a mis abuelitas Rosalía y Lichita, en especial a mi tía Gloria gracias a ella que me dio la oportunidad para descubrir cuanto amo la ciencia e investigación. Le agradezco infinitamente al Dr. Cornejo el darme la oportunidad de trabajar para él, así mismo a su esposa Dra. Aracely por sus consejos y sobre todo su amistad. Al Dr. Siegel por la oportunidad de trabajar en una estancia en la Universidad de Minnesota, quiero darle las gracias a Julio por haberme ayudado en partes del proyecto así mismo a mis demás compañeros de Laboratorio en especial a Dalia y Ayla.

A mi futura esposa Sara por el apoyo que me ha brindado desde que nos conocimos hasta la fecha. Por último, le doy gracias a Dios por todas las bendiciones que ha dado.

"El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir"

— Albert Einstein

Contenido

Estancia Académica Universidad de Minnesota	8
I. CAPITULO: INTRODUCCION	9
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	17
I.1 Justificación.....	18
I.2 Objetivo General:.....	18
I.3 Objetivos Específicos:	19
I.4 HIPÓTESIS:	19
III. ANTECEDENTES	20
I.5 Suspensión, emulsión y dispersión.....	21
I.6 Polimerización por suspensión	23
I.7 Polímeros con respuesta a estímulos	23
I.7.1 Polímeros termosensibles	25
I.7.2 Polímeros sensibles a pH.....	27
I.8 Efecto permeación retención	28
I.9 Un breve vistazo a la anatomía de un vehículo de administración de fármacos.....	29
IV. EXPERIMENTAL	35
I.10 METODOLOGÍA:.....	36
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
I.11 Síntesis de Polímeros biocompatibles con núcleo catiónico	40
I.11.1 Síntesis de nanogeles entrecruzados con EDGMA y DVA.....	40
I.11.2 V.1.3. Contenido de grupos amino en los nanogeles sintetizados.....	42
I.11.3 V.1.3. Efecto de la temperatura y el pH en el tamaño de los nanogeles sintetizados.....	43
I.11.3 Efecto del tiempo y el pH en la estabilidad de los nanogeles sintetizados.	48
VI. CONCLUSIONES	55
VII. BIBLIOGRAFIA	57
VIII. Anexos.....	66
I.12 Liberación intranasal de Diazepam.....	67
I.12.1 Introducción	67
I.13 Protocolos.....	68
I.13.1 Cultivo Celular	68
I.13.2 Pasaje de Células.....	69

I.13.3	Ensayo de permeabilidad con amarillo lucifer	71
I.13.4	Procedimiento:.....	71
I.13.5	Medida de la integridad de la monocapa	71
I.14	Creación de superficies antiincrustantes con capacidad de auto renovación	77
I.15	Materiales y métodos.....	78
I.15.1	Síntesis del polímero	79
I.15.2	Preparación de las películas de nano compuestos	80
I.15.3	Caracterización.....	80
I.16	Resultados.....	81

RESUMEN

"Síntesis de nanogeles biocompatibles, con núcleo catiónico sensible al medio ambiente y su aplicación como sistemas de liberación de fármacos"

Por

Q.F.B. Rafael Castro Marín

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Universidad Autónoma de Baja California

Profesor Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Director de tesis

Profesor Dra. Aracely Serrano Medina

Co-Director de tesis

En este proyecto se obtuvieron nanogeles mediante la técnica de polimerización por emulsión sin detergente de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y metacrilato de N,N-dietilaminoetilo (DEMAEM), estabilizados con metacrilato de polietilenglicol (PEGMAM). Se espera que el núcleo estará formado por el material sensible a la temperatura NIPAAm para que el sistema tenga respuesta al mencionado factor. Los nanogeles obtenidos serían evaluados en su capacidad de carga de fármacos modelo: 5-fluorouracilo (5-FU). Los geles cargados fueron evaluados en su cinética de liberación de fármacos en diferentes condiciones de pH. La selección del 5-FU se basó en que el fármaco es un antimetabolito con un amplio espectro de actividad contra tumores sólidos (del tracto gastrointestinal, ovario, hígado, cerebro, pulmón, etc.). El uso clínico de este fármaco se ha visto limitado debido al desarrollo de resistencia por las células tumorales. Por otra parte 5-FU presenta tiempo de vida media corta y biodisponibilidad variable cuando se administra por vía oral debido al metabolismo en el tracto gastrointestinal. En las soluciones inyectables se producen productos cardiotoxicos de la degradación de 5-FU en medio básico. La terapia de 5-FU puede mejorarse y disminuirse su toxicidad si se logra la acumulación del fármaco en la región infectada por el tumor y se prolonga la exposición de las células a este agente, por lo que es necesario el desarrollo de estos sistemas de liberación de este fármaco con escala nanométrica.

En este proyecto se utilizaron dos tipos de entrecruzantes: el dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y el 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5]-undecano (divinal acetal, DVA) el cual es un compuesto que se hidroliza en medio ácido ($\text{pH} < 6.5$). Esto con el objeto de estudiar el efecto del entrecruzante en las propiedades de los nanogeles y obtener materiales que se hidrolicen en medio ácido, por ejemplo, al ser internalizados por las células, de tal forma que los productos de la hidrólisis puedan ser eliminados por vía renal. La metodología se adaptará para determinar la efectividad de la liberación de fármacos antineoplásicos atrapados en las nanopartículas sintetizadas.

ESTANCIAS ACADÉMICAS

Estancia Académica Universidad de Minnesota

Se realizó una estancia académica de junio a octubre del 2015 donde se trabajó en dos proyectos diferentes, el primero de ellos fue “Liberación intranasal de diazepam” en la escuela de Farmacia Universidad de Minnesota y el segundo “Creación de superficies antiincrustantes con capacidad de auto-renovación” en la escuela de Bioingeniería Médica de la misma Universidad, bajo el tutorado del Dr. Ronald A. Siegel, cabe mencionar que el primer proyecto está protegido con derechos de propiedad intelectual y está trabajándose en la patente por lo cual no se entrará en detalle, ni discusión de resultados solo se describirán las técnicas aprendidas durante el trabajo en el proyecto, para el segundo se describirán y discutirán resultados, así como la descripción del procedimiento de obtención del material sintetizado, dicha información estará contenida en los Anexos.

I. CAPITULO: INTRODUCCION

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento descontrolado, así como su propagación de células anormales. Los tratamientos incluyen cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, terapia inmune, y la terapia dirigida (fármacos que interfieren específicamente con el crecimiento de células cancerígenas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que en dos décadas habrá 22 millones de decesos por cáncer al año, a nivel mundial. En México, actualmente se registran 120 mil muertes a causa de cáncer al año, es decir 333 decesos por día y 14 por hora, según especialistas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado (ISSSTE).

El problema con los fármacos anticancerígenos se debe a que su distribución sistémica causa reacciones adversas y toxicidad asociada al mismo, el tratamiento es sumamente prolongado depende del estadio en el que se encuentre la enfermedad, cuentan con un estrecho margen terapéutico, por último, carecen de especificidad ya que atacan también a las células.

Los mecanismos de acción de los medicamentos utilizados convencionalmente muestran, entre algunas de sus dificultades generales, la imposibilidad para trasladar a los principios activos de forma directa a regiones específicas del organismo. La distribución sistémica de los fármacos provoca las reacciones adversas y la toxicidad asociada a los mismos. Para resolver esta situación se busca la vectorización de los fármacos, esto es, liberar los fármacos directamente al sitio de acción, en la cantidad adecuada y en el momento preciso que se requiera. Para esto es necesario desarrollar sistemas de liberación los cuales deben cumplir con ciertas características, como lo son la baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y una larga vida media en el organismo. Todas estas características son favorecidas por la aplicación de la nanotecnología en este campo, la cual permite que por medio de la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, se libere el fármaco de la forma menos invasiva y tóxica para tejidos y células que no necesiten del tratamiento farmacológico¹.

Es decir, la escala nanométrica permite que dichos dispositivos de transporte, interaccionen con poros y membranas celulares de una manera selectiva. Dentro de los sistemas de liberación estudiados se encuentran los nanogeles los cuales se definen como una red polimérica ligeramente entrecruzada en la cual se encuentra embebido un disolvente o solución. Se requiere que los nanogeles tengan un tamaño menor de los 200 nm de tal forma que se pueda facilitar su entrada a la célula por endocitosis, en un mecanismo mediado por receptor, a la vez que se reduce la captura de la nanopartícula por el sistema fagocítico mononuclear (MPS, por sus siglas en inglés); consecuentemente esto incrementará significativamente el tiempo de circulación en la sangre².

La vectorización de nanogeles hacia tejidos blanco se ha logrado mediante la bioconjugación de la superficie del nanogel con ligandos específicos que pueden reconocer receptores en células dañadas. En el caso de la vectorización a tejidos cancerígenos, los ligando efectivo para células cancerígenas incluyen derivados del ácido fólico, péptidos, proteínas, y anticuerpos³.

Se ha demostrado que las nanopartículas pueden acumularse de manera pasiva (aun sin la bioconjugación con ligandos específicos), en los tumores cancerígenos debido a que estos presentan un endotelio más permeable (poros de mayor diámetro) y un sistema linfático menos permeable que los tejidos sanos, fenómeno conocido como “permeación-retención incrementada” (EPR por sus siglas en inglés), por lo que nanogeles con un diámetro entre 50 y 200 nm son útiles para liberar fármacos de manera selectiva en tumores cancerígenos⁴. También se ha demostrado que los nanogeles pueden penetrar el endotelio vascular cerebral, por lo que pueden utilizarse para administrar fármacos al sistema nervioso central, burlando la barrera hematoencefálica⁵.

En los últimos años se ha incrementado el uso en la terapéutica de biofármacos, tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos antisentido, siRNA y DNA. Estas moléculas tienen propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas muy especiales

tales como pobre permeabilidad de membranas y tiempos de vida media muy corta; por lo que es indispensable el uso de acarreadores que mejoren su biodisponibilidad. Los nanogeles han demostrado ser un sistema de liberación eficiente para este tipo de moléculas que además permite la administración por vía oral ya que se ha demostrado que las nanogeles pueden penetrar el epitelio gastrointestinal y transportar así estas moléculas que de otra manera tiene una biodisponibilidad nula⁶.

Por otra parte, se ha demostrado el efecto de hormonas y péptidos incrementa considerablemente si se administra de manera pulsátil, por lo que el desarrollo de sistemas que liberen solutos de manera cíclica es un área de oportunidad en el desarrollo de materiales⁷.

Una característica indispensable en las nanopartículas (incluyendo nanogeles) con aplicación farmacéutica es que sean biocompatibles. Eso se puede lograr si las nanopartículas contienen cadenas de polietilenglicol (PEG) en su superficie el cual les proporciona propiedades de camuflaje en el torrente sanguíneo, asegurando la persistencia en circulación sanguínea. En adición, las cadenas de PEG en la superficie o coraza de las nanopartículas polimérica muestran un movimiento rápido en medio acuoso y tienen un gran volumen excluido. La repulsión estérica que resulta de una pérdida de entropía conformacional de las cadenas del PEG y de una baja energía libre interfacial contribuye a las propiedades fisiológicas de las nanopartículas poliméricas que son cubiertas con PEG^{8,9}.

Una vez que las nanopartículas penetran en el tejido blanco es necesario un mecanismo que permita la liberación del fármaco. Una estrategia es el desarrollo del estímulo-respuesta de nanopartículas “PEGiladas” mediante la incorporación de segmentos de polímeros inteligentes que puedan inducir cambios importantes en las características de las partículas en respuesta a estímulos externos como metabolitos, fuerzas iónicas, temperatura, pH, etc. En particular, se han diseñado nanogeles “pegiladas” que responden al pH, para aplicaciones biomédicas, tomando en cuenta que los tumores, la piel, y los endosomas/lisozomas presentan un pH más ácido

comparado con el tejido normal (pH 7.4). Estos nanogeles contienen grupos amino los cuales se ionizan en medio ácido y provocan el hinchamiento del nanogel. Esta propiedad ha sido utilizada para la liberación de fármacos y como microreactores catalíticos¹⁰.

Otro estímulo que es de gran interés es la temperatura, considerando que los tumores, debido a su acelerado metabolismo, presentan mayor temperatura que el tejido sano y que, además, es factible incrementar la temperatura en un área específica del cuerpo mediante una fuente de calor externa. Uno de los materiales termosensibles más estudiados es la N-isopropilacrilamida (NIPAAm) ya que los polímeros lineales de este material sufren una transición de fase de ovillo expandido a glóbulo contraído (soluble a precipitado) mientras que los hidrogeles sufren una transición de hinchado a colapsado a una temperatura crítica (LCST) de aproximadamente 32°C^{11,12}

Dada la proximidad de la LCST a la temperatura corporal (37°C), la poli (NIPAAm) (PNIPAAm) es un candidato potencial como acarreador biomédico, tanto como polímero lineal, hidrogel o copolímero. PNIPAAm se ha estudiado para el suministro de fármacos con el blanco en tumores, en recubrimientos termosensibles, en micelas para la liberación controlada de fármacos, y como superficie de fijación-desprendimiento de células vivas. PNIPAAm se ha utilizado también en soluciones oftálmicas, ya que no se ha encontrado citotoxicidad in vitro¹³.

Existen varias estrategias sintéticas para la preparación de nanogeles, estas incluyen métodos fotolitográficos y micromolde, microfluidos, modificaciones de biopolímeros con varias estrategias, y polimerización heterogénea por radicales libres en dispersión, precipitación, miniemulsión inversa y microemulsión inversa. Además, los avances recientes en polimerización radicalica controlada-viviente (CRP) en medio heterogéneo ha permitido preparar nanogeles con propiedades únicas para la liberación de fármacos^{1,3}. En el caso de PNIPAAm se han preparado nanopartículas por polimerización por dispersión aprovechando sus propiedades termosensibles ya

que la polimerización se lleva a cabo por arriba de la LCST de tal forma que cuando inicia la polimerización la cadena que se inicia forma un núcleo hidrofóbico en el cual se incorpora monómeros y entrecruzante, formándose así una nanogel. Se han preparado nanogeles incorporado unidades ionizables tales como el ácido metacrílico para producir además sensibilidad al pH¹⁴. De igual manera se han formado nanogeles núcleo coraza por adición de monómero en etapas¹⁵.

Por lo general el tamaño de estas nanopartículas se controla mediante el uso de tensoactivos los cuales requieren eliminarse una vez obtenidas los nanogeles, mediante un proceso exhaustivo de purificación. Otra desventaja es que el rendimiento es generalmente bajo y requiere adecuar el método de adición de los monómeros para mejorar el rendimiento¹⁶. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar metodologías de obtención de nanogeles que no requiera del uso de tensoactivos. Se requiere, además, que el método de preparación sencillo que permita producir nanogeles a gran escala.

En cuanto al cargado de fármacos en nanogeles, este se ve favorecido por la interacción entre los grupos funcionales en el núcleo del nanogel y los del fármaco. Sin embargo se ha observado que las interacciones hidrofóbicas no son suficientes para un cargado eficiente por lo que es necesario la inclusión de grupos ionizados en el núcleo de la partícula que permita una interacción iónica con fármacos de carga opuesta¹⁷.

La liberación de los fármacos a partir de geles sensibles puede ocurrir por dos procesos:

a) por hinchamiento del gel cuando la temperatura ambiental es menor que la LCST (control negativo).

b) cuando el gel se colapsa al pasar de una temperatura por abajo, a una temperatura por arriba de la LCST (control positivo)^{11,12,17}

Este último mecanismo es preferible dado que la temperatura de los tumores es mayor que la temperatura corporal y que se puede inducir el cambio de temperatura de manera externa¹¹, además, en este caso la liberación es generada por la presión producida al colapsarse el gel y no por mecanismos de difusión que por lo general se desvían de la linealidad. Para el control positivo de la liberación se requiere que la LCST este por arriba de la temperatura corporal para que el nanogel se colapse cuando pase de la circulación sanguínea al tumor canceroso o se induzca un incremento local de la temperatura. Para esto es necesario ajustar la temperatura de transición de la PNIPAAm por arriba de la temperatura corporal mediante la copolimerización con monómeros hidrofílicos o ionizados¹².

La LCST de PNIPAAm ha sido modificada por la introducción de cargas negativas mediante copolimerización con ácido acrílico o metacrílico, sin embargo, dado la hidrofiliencia intrínseca de estos monómeros la transición en el grado de hinchamiento se pierde con la introducción de una fracción pequeña de comonómeros¹⁸⁻²⁰. Hemos demostrado que, en macrogeles, se puede ajustar la LCST de PNIPAAm por arriba de la temperatura corporal por copolimerización con comonómeros ácidos anfifílicos, tanto alifáticos (metacrilatos de carboxialquilo)²¹, como aromáticos (metacrilatos de carboxiarilo)²².

En el primer caso, se observó que la temperatura de transición y el grado de hinchamiento es afectada por la longitud de la cadena alifática (grado de hidrofobicidad); mientras que con la serie aromática, el tipo de isómero (orto, meta o para) del ácido metacriloiloxibenzoico utilizado tiene también un efecto en la temperatura de transición y el grado de hinchamiento²².

En este proyecto se propuso obtener nanogeles mediante la polimerización por emulsión sin detergente de NIPAAm y metacrilato de metacrilato de N,N-dietilaminoetil (DEMAEM), estabilizados con metacrilato de polietilenglicol (PEGMAM)^{23,24}. Se espera El núcleo estará formado por el material sensible a la temperatura NIPAAm para que el sistema tenga respuesta al mencionado factor. Los

nanogeles obtenidos serán evaluados en su capacidad de carga de fármacos modelo: 5-fluorouracilo (5-FU). Los geles cargados fueron evaluados en su cinética de liberación de fármacos en diferentes condiciones de pH, temperatura. La selección del 5-FU se base en lo siguiente:

5-FU (PM=130.078 g/mol). Es un antimetabolito con un amplio espectro de actividad contra tumores sólidos (del tracto gastrointestinal, ovario, hígado, cerebro, pulmón, etc). El uso clínico de este fármaco se ha visto limitado debido al desarrollo de resistencia por las células tumorales. Por otra parte 5-FU presenta tiempo de vida media corta y biodisponibilidad variable cuando se administra por vía oral debido metabolismo en el tracto gastrointestinal. En las soluciones inyectables se producen productos cardiotoxicos de la degradación de 5-FU en medios básico²⁵. La terapia de 5-FU puede mejorarse y disminuirse su toxicidad si se logra la acumulación del fármaco en la región infectada por el tumor y se prolonga la exposición de las células a este agente, por lo que es necesario el desarrollo de este sistema de liberación de este fármaco con escala nanométrica. El 5-FU es un fármaco poco soluble en agua con un pKa de 8.2 (ácido débil) por lo que es un buen modelo de fármaco no ionizado en medios fisiológicos.

En el proyecto se utilizarán dos tipos de entrecruzantes: el dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y el 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5]-undecano (divinal acetal, DVA) el cual es un compuesto que se hidroliza en medio ácido (pH<6.5)²⁸. Esto con el objeto de estudiar el efecto del entrecruzante en las propiedades de los nanogeles y obtener materiales que se hidrolicen en medio ácido, por ejemplo, al ser internalizados por las células, de tal forma que los productos de la hidrólisis puedan ser eliminados por vía renal. La metodología se adaptará para determinar la efectividad de la liberación de fármacos antineoplásicos atrapados en las nanopartículas sintetizadas.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

I.1 Justificación

Actualmente los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer presentan baja biodisponibilidad además de que su uso es prolongado, tienen un margen terapéutico estrecho; la distribución sistémica de los fármacos provoca reacciones adversas y toxicidad asociada a la administración sistémica así como la carencia de especificidad, nuestro laboratorio propone la síntesis de nanogeles con núcleo catiónico, para crear un sistema de liberación de fármacos anticancerígenos utilizando nanogeles estos son muy prometedores como para administrar fármacos ya que cuentan con una alta capacidad de carga, estabilidad y una gran respuesta al medio ambiente, cabe mencionar que los grupos catiónicos son importantes para la interacción con fármacos de carga opuesta como los ácidos, sin dejar fuera las pequeñas dimensiones que pueden alcanzar dependiendo el método empleado para su síntesis (<200 nm). Los nanogeles pueden infiltrarse en tumores y tejidos inflamados por el efecto premiación retención aumentado, otra de las grandes ventajas es que el sistema propuesto para la síntesis utiliza agua y no solventes por lo tanto no se requiere de tratamientos adicionales para removerlos.

I.2 Objetivo General:

Optimizar la formulación para obtener un tamaño mínimo de nanogeles preparados por un método por emulsión sin detergente de contengan grupos amino y sensibilidad a la temperatura y cargarlos con 5-FU y evaluar la liberación del fármaco en respuesta a cambios en el medio ambiente.

I.3 Objetivos Específicos:

- Obtener una serie de nanogeles con coraza de polietilenglicol y núcleo de NIPAAm y monómero básico.
- Optimizar las condiciones de síntesis de los nanogeles para obtener un tamaño mínimo.
- Caracterizar la respuesta de los nanogeles al pH.
- Cargar los nanogeles con 5-fluorouracilo por el método de equilibrio.
- Estudios de liberación de los nanogeles cargados con 5-FU

I.4 HIPÓTESIS:

Es posible producir nanogeles con coraza de polietilenglicol y núcleo sensible al pH, la temperatura; mediante polimerización por emulsión sin detergente en un solo paso y la inclusión de monómero con grupo amina. Dichos nanogeles tendrían la capacidad de cargado y liberación de fármacos.

III. ANTECEDENTES

Antes de 1950 la mayoría de los fármacos se convirtieron en formulaciones de píldoras o capsulas cuya función era liberar el principio activo cargado inmediatamente tras el contacto con un ambiente acuoso sin ningún tipo de capacidad para controlar la cinética de liberación del mismo. En 1952 Smith Klein Beecham exteriorizó la primera formulación de liberación sostenida siendo capaz de controlar la cinética de liberación por un periodo de 12 horas²⁶.

La tecnología Spansule, permite el control de la cinética de liberación del fármaco a una velocidad determinada. En los primeros años, cuando comenzó la nueva tecnología de liberación de fármacos, varios terminos fueron introducidos para la descripción de nuevas formulaciones las cuales difieren entre sí. Las formulaciones de liberación controlada incluyen liberación sostenida, liberación retardada, liberación prolongada, entre otras. El término “liberación sostenida” es el más ampliamente utilizado en la actualidad, Después de varias décadas de avance en las tecnologías de liberación de fármacos, las pequeñas diferencias en las funciones que implican los diferentes nombres se ha convertido en innecesaria²⁷.

Aunque todavía es un tema de discusión, las nanopartículas pueden ser definidas como estructuras supramoleculares ultradispersadas, generalmente (pero no necesariamente) fabricadas de polímeros, ostentando un tamaño submicrométrico, preferiblemente menor a 500 nm. Se pueden obtener nanopartículas, nanoesferas (dispositivos de tipo matriz), nanocápsulas (dispositivos de depósito) dependiendo del proceso utilizado para la síntesis. El primer documento que habla de sobre nanopartículas fue publicado en 1976 por Peter Speiser, considerado pionero en la concepción de las nanopartículas^{28,29}.

I.5 Suspensión, emulsión y dispersión

Los detalles y el progreso de suspensión, emulsión, dispersión y polimerizaciones se revisan regularmente en publicaciones especializadas de polímeros. Los procedimientos de polimerización heterogénea o de formación de partículas son por lo general sistemas de dos fases en el que el monómero de partida

(s) y / o el polímero resultante están en la forma de una fina dispersión en un líquido inmiscible. El iniciador de la polimerización puede ser soluble en el monómero o el líquido, y puede o no puede estar presente dentro de las partículas poliméricas durante su formación.

Además de los monómeros, el medio de polimerización e iniciador, también se añaden uno o más aditivos a la mezcla de polimerización para emulsionar los monómeros, y / o para estabilizar las gotitas de monómero y las partículas de polímero resultantes. Varias combinaciones de las posibilidades antes mencionados se emplean en condiciones empíricamente ajustadas para producir partículas esféricas de polímero dentro del rango que va de los 50 nm a 1 a 2 mm o más grande.

Hay básicamente cuatro técnicas diferentes empleadas para la fabricación de partículas, mediante polimerización de adición de monómeros de vinilo. Estos se denominan convencionalmente procesos de "suspensión" "emulsión" o en base al tamaño de las partículas de polímero producidas. Una línea divisoria arbitraria entre la emulsión y la suspensión es el tamaño de la gota/partícula de 1 μm (1000 nm). Los líquidos que contienen gotas/partículas menores a 1 μm son conocidas como emulsiones, y aquellos que contienen partículas más grandes de 1 μm como suspensión. El término "polimerización en dispersión" se ha adoptado debido a que la técnica sustituye el proceso de dispersión de polímeros en la industria de la pintura. La polimerización por precipitación es la que conduce a la formación de precipitados del polímero aun nivel macroscópico. La palabra "dispersión" se utiliza también para describir a las dispersiones líquido/sólido en de forma general. La terminología empleada ("suspensión", "emulsión", "dispersión refractiva," y "precipitación") por los químicos de polímeros para los sistemas de polimerización heterogénea se rige por 4 criterios³⁰:

1. Estado inicial de la mezcla de polimerización
2. Cinética de la polimerización
3. Mecanismo de formación de partículas

4. La forma y tamaño de las partículas de polímero finales.

I.6 Polimerización por suspensión

En la polimerización en suspensión el iniciador es soluble en el monómero, y estos dos son insolubles en el medio de polimerización. La relación en volumen de la fase de monómero al medio de polimerización por lo general se mantiene dentro de 0,1-0,5, pero, en principio, puede ser tan alta como la unidad o incluso más. La fase de monómero es, por medio de un agitador y un estabilizador de gotita adecuado (agente de suspensión), se suspendieron en el medio en forma de pequeñas gotitas (microgotas). La polimerización se inicia a continuación, a la temperatura deseada (20 a 100 ~ y por lo general se dejó proceder a la terminación (~ 100%). En estas condiciones, el monómero "microgotas" se convierte directamente en el polímero correspondiente "microperlas" de aproximadamente la mismo tamaño.

I.7 Polímeros con respuesta a estímulos

Las terapias farmacológicas y biológicas a menudo están limitadas por una vida media corta, la mala biodisponibilidad e inestabilidad física y química. La inestabilidad física incluye principalmente la alteración de la estructura de proteínas, dando lugar a procesos indeseables, tales como la desnaturalización, agregación y precipitación. Las reacciones tales como la oxidación, desamidación, racemización e hidrólisis contribuyen a la inestabilidad química de los fármacos. Los polímeros sensibles a estímulos ofrecen una plataforma de administración de fármacos que puede ser utilizada para suministrar fármacos a una velocidad controlada y en forma estable, así como biológicamente activa. Durante muchas décadas, el interés en los polímeros sensibles a estímulos ha ido aumentando y gran cantidad de trabajo ha estado comprometida con el desarrollo de macromoléculas ambientalmente sensibles que pueden ser moldeados en nuevos polímeros inteligentes³¹.

Un polímero sensible a estímulos o inteligente se somete a un cambio brusco en sus propiedades físicas en respuesta a un pequeño estímulo ambiental. Estos polímeros también se les conocen como polímeros inteligentes debido a que los pequeños cambios se producen en respuesta a un factor externo hasta que se alcanza un punto crítico, y tienen la capacidad de volver a su forma original después del ese efecto desencadenador se retira³²⁻³⁴. La exclusividad de estos polímeros se encuentra en su respuesta no lineal provocada por un estímulo muy pequeño y que produce una notable alteración macroscópica en su estructura. En la figura 1, se representa diversos estímulos responsables del control de liberación del fármaco a partir de sistemas de poliméricos inteligentes. Estas transiciones son reversibles e incluyen cambios en el estado físico, forma y solubilidad, las interacciones del disolvente, y los balances hidrofílicos y lipofílicos, así como su conductividad. Las fuerzas impulsoras detrás de estas transiciones incluyen la neutralización de grupos cargados por la adición de polímeros de carga opuesta o por un cambio en el pH, y cambio en el equilibrio o cambios hidrofílico / lipofílico o también en los puentes de hidrógeno debido al aumento o disminución de la temperatura. Los principales beneficios de los sistemas de administración de fármacos basados en polímeros inteligentes incluyen reducir la frecuencia de dosificación, la facilidad de preparación, mantenimiento de la concentración terapéutica deseada con dosis única, una liberación prolongada de fármaco, reducción de efectos secundarios y una mejor estabilidad³⁵⁻³⁷.

La capacidad de respuesta de una solución polimérica iniciado por estímulos físicos o químicos se limita a la destrucción y la formación de diversas fuerzas secundarias, incluyendo puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals e interacción electrostáticas^{38,39}. Algunas reacciones incluidas, tales como la oxidación, la reacción ácido-base, reducción e hidrólisis de restos unidos a la cadena polimérica. En algunos casos, el cambio conformacional en la estructura polimérica se produce por la degradación de la estructura polimérica debido a la rotura del enlace irreversible en respuesta a un estímulo externo. Los atributos críticos de un polímero inteligente deben incluir: biodegradabilidad y biocompatibilidad; perfil de liberación

controlada; alta capacidad de carga; y la eliminación de toxicidad sistémica, inmunogenicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción, y un excelente perfil de estabilidad.

I.7.1 Polímeros termosensibles

Los polímeros termosensibles experimentan un cambio brusco en su solubilidad en respuesta a un pequeño cambio en la temperatura. Una solución polimérica acuosa termosensible muestra las transiciones sol-gel que son dependientes de la temperatura y reversiblemente cerca de la temperatura del cuerpo que controlan la velocidad de liberación del fármaco incorporado junto con el mantenimiento de la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica. Este fenómeno es generalmente gobernado por la relación de hidrófila a restos lipófilos en la cadena polimérica, es un fenómeno impulsado por energía que depende de energía libre de la mezcla o la entalpía o la entropía del sistema. Un rasgo característico común de polímeros termosensibles es la presencia de grupo hidrófobo, tal como grupos metilo, etilo y propilo. Estos polímeros poseen dos parámetros críticos adicionales, es decir, la temperatura de solución crítica inferior (LCST) y temperatura crítica superior solución (LCST)⁴⁰⁻⁴².

La temperatura baja de solución crítica es la temperatura por encima de la cual el sistema polimérico de monofase se convierte en hidrófobo e insoluble, como resultado se obtiene una separación de fases, mientras que por debajo de la LCST de los polímeros son solubles. Para polímeros que tienen LCST, un pequeño aumento en la temperatura, tendrá un efecto negativo en la energía libre del sistema (ΔG) que conduce a un término de entropía más alto (ΔS) con respecto a al incremento en termino de entalpía (ΔH) en la relación termodinámica $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. La entropía aumenta debido a la asociación agua-agua. En contraste con los sistemas UCST, un sistema LCST se prefiere para el desarrollo tecnológico de administración de fármacos debido a la necesidad de altas temperaturas para los sistemas de UCST, lo cual es desfavorable para los medicamentos termolábiles y biomoléculas. De acuerdo con la

fase de respuesta para el cambio de temperatura, los polímeros se subdividen en termosensibles negativamente, termosensibles positivamente, y en termorreversibles⁴². Los polímeros termosensibles más comúnmente incluyen poli poli(*N*-isopropilacriladamida), poli (*N*, *N*-dimetilacrilamida), poli (*N*-vinilalquilamida), poli(*N*-vinilcaprolactama), derivados de fosfaceno, plurónicos, Tetrónicos , derivados de polisacáridos , quitosano y copolímeros PLGA-PEG-PLGA^{42,43}.

La poli(*N*-isopropilacriladamida) o NIPAAm es un polímero termosensible con una temperatura de solución crítica inferior de 32 °C que se puede desplazar a la temperatura corporal mediante la formulación con agentes tensoactivos o aditivos. Estos polímeros exhiben características únicas con respecto a su marcada transición casi discontinua. Esto hace de poli (NIPAAm) un excelente vehículo para la administración de fármacos in situ. La gelificación de soluciones de polímero al 5% se produce a diferentes temperaturas en buffer de fosfatos salino (PBS). A medida que la temperatura aumenta a 27 °C, la solución de polímero claro se vuelve turbia y al calentar aún más la solución se forma un gel. A la temperatura de gel cada vez menor de 45 °C se produce expulsión de agua del gel se produce. El uso de poli NIPAAm es limitado debido a la citotoxicidad atribuida a la presencia de amonio cuaternario en su estructura, al no ser biodegradable y su capacidad para activar las plaquetas al contacto con fluidos corporales.

La principal ventaja de los sistemas poliméricos termosensibles es evitar el uso de orgánicos tóxicos, la capacidad de suministrar fármacos tanto hidrofílicos y lipofílicos, reduce los efectos secundarios sistémicos, la administración de fármacos sitio específica, y propiedades de liberación sostenida. A pesar de estas ventajas hay varios inconvenientes asociados con estos sistemas incluyen la liberación de rápida de fármaco, baja resistencia mecánica del gel que lleva a falta potencial, vaciado de la dosis lo cual genera algún efecto adverso, falta de biocompatibilidad del sistema polimérico y una disminución gradual del pH del sistema debido a la degradación ácida^{44,45}.

I.7.2 Polímeros sensibles a pH

Todos los polímeros sensibles al pH cuentan con un grupo ácido o básico que puede aceptar o liberar un protón en respuesta a cambios en el pH del medio ambiente. Los polímeros con un gran número de grupos ionizables son conocidos como polielectrolitos. Los polielectrolitos se clasifican en dos tipos: poliácidos débiles y polibases débiles. Los poliácidos débiles aceptan protones a un pH bajo y liberan protones a pH neutro y básico⁴⁶. Los poliácidos sensibles a pH más utilizados son el poli (ácido acrílico) (PAAc) y poli (ácido metacrílico) (PMAAc)⁴⁷.

Debido a los cambios de pH del medio ambiente, el grupo ácido se somete a una ionización a un pH específico denominado pKa. Este cambio rápido de carga neta del grupo provoca alteraciones en la estructura molecular de la cadena polimérica. Esta transición a estado expandido está mediada por la presión osmótica ejercida por los contraiones móviles neutralizados por las cargas de la red. Los polímeros sensibles al pH que contienen un grupo sulfonamida son otro ejemplo de polímeros de poliácidos. Estos polímeros tienen valores de pKa que van 3 a 11 y el átomo de hidrógeno del nitrógeno de la amida se ioniza fácilmente para formar poliácidos. El rango estrecho de pH y una buena sensibilidad es la principal ventaja de estos polímeros sobre los polímeros compuestos de ácidos carboxílicos.

El quitosano es un biopolímero policatiónico soluble en solución ácida y se somete a separación de fases en un intervalo de pH próximo al de neutralidad a través de la desprotonación del grupo amino primario por iones inorgánicos. El mecanismo de gelificación del quitosano se produce a través de las siguientes interacciones que implican la atracción electrostática entre el grupo amonio del quitosano y un ion inorgánico, los puentes de hidrógeno entre las cadenas de quitosano, y las interacciones hidrofóbicas de quitosano-quitosano. Sin embargo, el gel formado se encuentra con la necesidad de tener más entrecruzantes para producir un gel con una estabilidad mecánica suficiente y para así liberar fármaco de bajo peso molecular de forma controlada. Varios estudios informaron que la resistencia estructural de

quitosano depende de la porosidad del gel que a su vez, es una función de la cristalinidad del polímero. La resistencia estructural del polímero se puede mejorar, ya sea mediante la mezcla con otros polímeros o por modificación hidrófoba del polímero. Un ejemplo incluye el entrecruzamiento de quitosano con Polivinilpirrolidona o con glutaraldehído para formar una red polimérica semi-interpenetrante que gelifique in situ a pH fisiológico. Las polibases que lleva un grupo amino unido, son el grupo polibásico más representativo. Como la Poli(*N*, *N*-dimetilaminetilmetacrilato) (PDMAEMA) y poli(*N*, *N*-dietilanimioetilmetacrilato) (PDEAEMA) han sido las bases poliméricas de uso más frecuente debido a su sensibilidad al pH. El grupo amino se ioniza a pH bajo. PDEAEMA tiene una conformación hiperenrollada debido a la presencia de grupos hidrófobos grandes, como grupos etilo, que inducen interacciones hidrófobas fuertes como la fuerza de agregación. La introducción de un resto más hidrófobo puede ofrecer una conformación más compacta y una fase más discontinua. Poli (4 o 2-vinilpirrolidona) (PVP), poli (vinil-imidazol) (PVI) y poli (propilenimina) también se han explorado para su uso en la administración de fármacos⁴⁸.

1.8 Efecto permeación retención

Como ya sea había discutido antes los se han encontrado varias aplicaciones para los nanogeles en varios campos, como la detección⁴⁹, el diagnóstico^{50,51} y la bioingeniería⁵², pero su mayor impacto ha sido en el área de administración de fármacos. Los nanogeles y otros sistemas de administración de fármacos de tamaño nanométrico tienen varias ventajas sobre los sistemas de entrega macro de tamaño. Por ejemplo, uno de los aspectos clave en la administración de fármacos se controla la liberación de fármacos. La Figura 2, muestra los perfiles la liberación de los vehículos para la administración de fármacos "ideal", en los destacan la ventana terapéutica: las concentraciones que se encuentran por encima de la ventana el fármaco podría causar efectos secundarios tóxicos, mientras que por debajo de este límite el fármaco sería ineficaz como agente terapéutico⁵³. Aunque tal control se puede conseguir en los sistemas de tamaño macro, los sistemas de liberación de tamaño

nanométrico si son adecuadamente diseñados pueden lograr un control más preciso sobre la velocidad temporal de liberación de fármaco debido a su gran área de superficie. Los nanogeles también pueden ser sistemas inherentemente útiles que requieren una liberación explosiva. Los nanosistemas, a diferencia de los sistemas de administración de fármacos a granel, pueden acceder al interior de las células para suministrar los fármacos y pueden ser diseñadas para responder a las complejas señalizaciones intracelulares. Además, puesto que los nanomateriales pueden circular en el cuerpo después de haber sido inyectados tienen la capacidad para tratar enfermedades en el sitio del trastorno. Esta característica de los nanomateriales es especialmente útil en la terapia contra el cáncer, donde el tamaño del sistema de suministro es la clave para apuntar a tipos de cáncer a través del efecto de permeabilidad y retención (EPR)⁵⁴. Otro aspecto importante de la entrega de fármacos, que ahora se le está dando la importancia que merece es la estabilidad de la encapsulación. Esto es especialmente relevante debido a que cada vez que se revisan los parámetros termodinámicos como porcentaje de carga (%) no describen adecuadamente la estabilidad del vehículo de administración durante su circulación en la sangre, ya que estos vehículos podrían presentar fugas potenciales de fármaco en los sitios hidrofóbicos en los tejidos circundantes y componentes de la sangre. Los vehículos de liberación, a partir de una única plataforma, que pueden satisfacer todos los requisitos básicos de un vehículo de liberación nanoscópico y que sea versátil son bastante raros. Sin embargo, estas características, son las bases de un buen vehículo de liberación y son requisitos fundamentales del diseño. Así, hay aspectos clave de un diseño de vehículo de liberación (ver Fig. 1). Cada uno de estos aspectos se tratará individualmente en esta revisión y se introducen brevemente a continuación⁵⁵.

I.9 [Un breve vistazo a la anatomía de un vehículo de administración de fármacos](#)

- Estabilidad de encapsulación: Los fármacos deben estar encapsulados establemente de tal manera que éstos no se escapen prematuramente durante la circulación. Esto es esencial para asegurar la eficacia terapéutica máxima con efectos secundarios mínimos.
- Respuesta a estímulos: La estabilidad encapsulación es deseable durante la circulación, pero una vez que el fármaco llegue al sitio diana debe ser liberado.
- Orientación pasiva: Este aspecto del diseño es la clave para la orientación de los sistemas de liberación a varias enfermedades, especialmente, el cáncer y la artritis. Este aspecto del diseño, siendo controlado por el tamaño, también determina el tiempo de circulación y eliminación del cuerpo.
- Orientación activa: Esta estrategia se utiliza para apuntar fenotipos específicos de la enfermedad y así reducir los efectos secundarios. Un sistema de administración debe permitir en su diseño, unir ligandos activos dirigidos.
- Toxicidad: El sistema de liberación debe ser no tóxico y lo ideal es que sea biodegradable que a su vez con productos de degradación no tóxicos, que puedan ser eliminados fácilmente por el cuerpo.
- Facilidad de síntesis: Un aspecto menos importante para las investigaciones de laboratorio, pero crucial para la producción a escala industrial y aprobación definitiva por las agencias reguladoras como la FDA.

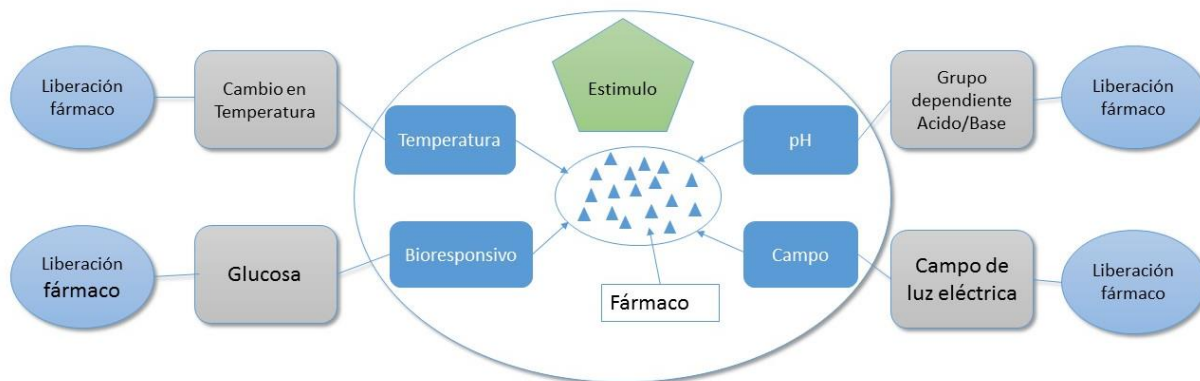


Figura 1. Diversos estímulos responsables del control de la liberación del fármaco a partir de sistemas de administración poliméricos inteligentes ³¹.

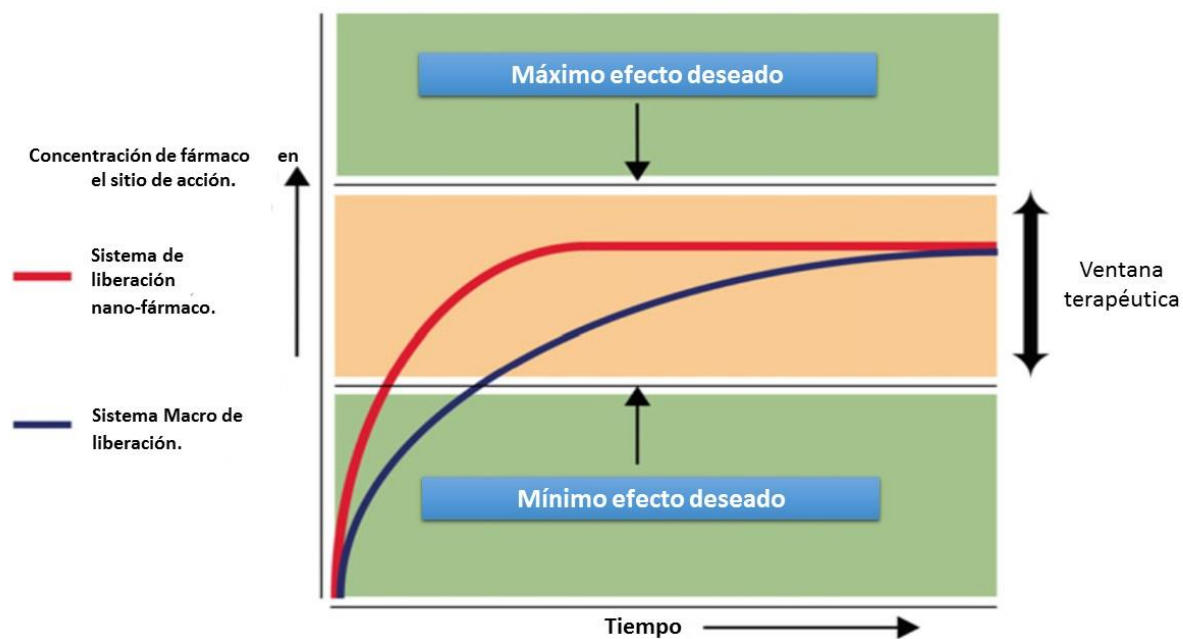


Figura 2. Perfil de liberación de un sistemas de administración de fármacos nano comparado con un sistema convencional⁵⁵.



Figura 3. Anatomía de un sistema de liberación de fármacos⁵⁵.

Tabla 1. Historia de la tecnología de la liberación de fármacos a partir de 1950 hasta el presente y la tecnología necesaria para el futuro*²⁷.

Año			
1950	1980	2010	2040
1er Generación	2da Generación	3er Generación	
Fundamentos básicos de liberación	Sistemas de liberación inteligentes	Sistemas de liberación modulados	
Liberación oral <ul style="list-style-type: none"> • Una o dos veces por día 	Liberación de orden cero <ul style="list-style-type: none"> • De primer orden vs orden cero 	Administración de fármacos poco solubles <ul style="list-style-type: none"> • Excipientes no tóxicos 	
Liberación Transdermal <ul style="list-style-type: none"> • Una vez por día o una vez por semana 	Liberación de péptidos y proteínas <ul style="list-style-type: none"> • Deposito a largo plazo utilizando polímeros biodegradables • Liberación pulmonar 	Liberación de péptidos y proteínas <ul style="list-style-type: none"> • Liberación > a 6 meses • Control de la cinética de liberación • Liberación no invasiva 	
Mecanismos de liberación <ul style="list-style-type: none"> • Disolución • Difusión • Osmosis • Intercambio iónico 	Polímeros Inteligentes e hidrogeles <ul style="list-style-type: none"> • Sensibles al medio ambiente • Liberación autorregulada (trabajo solo invitro) 	Polímeros Inteligentes e hidrogeles <ul style="list-style-type: none"> • Especificidad y sensibilidad a señales • Cinética de respuesta rápida (trabajando in vivo) 	
	Nanopartículas <ul style="list-style-type: none"> • Liberación tumor-especifica • Liberación de Genes 	Administración dirigida <ul style="list-style-type: none"> • No toxico para células que no son diana • Superación de la barrera hematoencefálica 	
Control exitoso de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas de liberación	Incapacidad de superar barreras biológicas	Necesidad de superar las barreas biológicas y fisicoquímicas	

Tabla 2. Las barreras a superar de los sistemas de liberación de la 3G*²⁷.

Tecnología de liberación	Barreras de formulación	Barreras biológicas
Liberación de fármacos con baja solubilidad en agua	<ul style="list-style-type: none"> • Nuevos excipientes que incrementen la solubilidad del fármaco 	<ul style="list-style-type: none"> • No tóxico para el cuerpo • No precipitación del fármaco en la sangre • IVIVC • Liberación a largo plazo a un año
Liberación Péptido/ proteína/ acido nucleico	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la cinética de liberación de fármacos • Control de la carga de fármaco • Control de periodo terapéutico 	<ul style="list-style-type: none"> • Entrega no invasiva • El control de biodistribución alterando la extravasación vascular, depuración renal, metabolismo, etc. • Navegación a través del microambiente de los tejidos enfermos para llegar a células diana
Liberación selectiva de fármaco usando nanopartículas	<ul style="list-style-type: none"> • Control del tamaño de las nanopartículas, forma, química de superficie, funcionalidad, y la flexibilidad • La modificación superficial con ligandos • Sistemas de liberación sensibles a estímulos 	<ul style="list-style-type: none"> • Paso por barreras endoteliales (por ejemplo, la barrera hematoencefálica) • Paso por las barreras mucosas • Funcional dentro del cuerpo • Funcional durante la vida útil de la liberación de los fármacos
Liberación de fármaco autorregulada	<ul style="list-style-type: none"> • Especificidad de la señal y la sensibilidad • Cinética de respuesta rápida • Capacidad para detener la liberación del fármaco 	

Tabla 3. Diversos materiales sensibles a estímulos³¹.

Estímulos ambiental	Material sensible
Temperatura	Poloxameros
	Poli(N-alquilacrilamida)
	Poli(N-vinilcaprolactama)
	Celulosa, xiloglucano
	Quitosano
pH	Poli(ácido metacrílico)
	Poli(vinilpiridina)
	Poli(vinilimidazol)
Luz	Poli(acrilamidas) modificadas
Campo Eléctrico	Poliestirenos sulfonados
	Poli(tiofenos)
	Poli(etiloxazolina)
Ultrasonido	Etilenvinilacetato

IV. EXPERIMENTAL

I.10 METODOLOGÍA:

IV.1.1 Purificación de NIPAAm

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 25g de NIPAAm y se disolvieron en 200 ml de hexano a 40°C, se agito vigorosamente hasta disolver completamente a la NIPAAm, posteriormente se filtró en caliente para eliminar las impurezas insolubles. Después de filtrada la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente en un baño de agua fría para recristalizar completamente a la NIPAAm. El sólido se filtró a vacío y se lavó con hexano frío (3 x 20 ml). Finalmente, el sólido (24.5g) se secó en la estufa de vacío a 25°C por 48 h.

IV.1.2. Purificación de DEAEM

El DEAEM se purifico por destilación a presión reducida del monómero. Se agregó una pequeña cantidad de hidroquinona al recipiente conteniendo el monómero y se procedió a destilar al vacío.

IV.1.2 Preparación de nanogeles

En un matraz bola se adicionaron por separado se prepararon con PEGMEM, N-isopropilacrilamida (NIPAAm), metacrilato de N,N-dietilaminoetil (DEAEM), y el entrecruzante etilenglicolmetacrilato (EGDMA) o el ácido lábil 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5] Undecano (DVA) en agua (1% en peso de solutos). Después de la eliminación de oxígeno burbujeando argón, la polimerización se llevó a cabo utilizando APS como iniciador al 2%ww, 0.02 g (8.7×10^{-8} mmol), con agitación constante, se continuó la polimerización por 45 minutos a a 85°C (Figura 4). Las emulsiones se purificaron por diálisis, utilizando membrana MWC de 12-14,000 Da. Posteriormente se recuperarán por liofilización. La proporción utilizada del grupo catiónico DEAEM fueron 5, 10 y 15% en moles y EDGMA o DVA al 3% molar, como entrecruzantes.

Obtención de nanogeles con NIPAAm/PEGMAM 5,10,15%, variando las relaciones DEAEM/geles

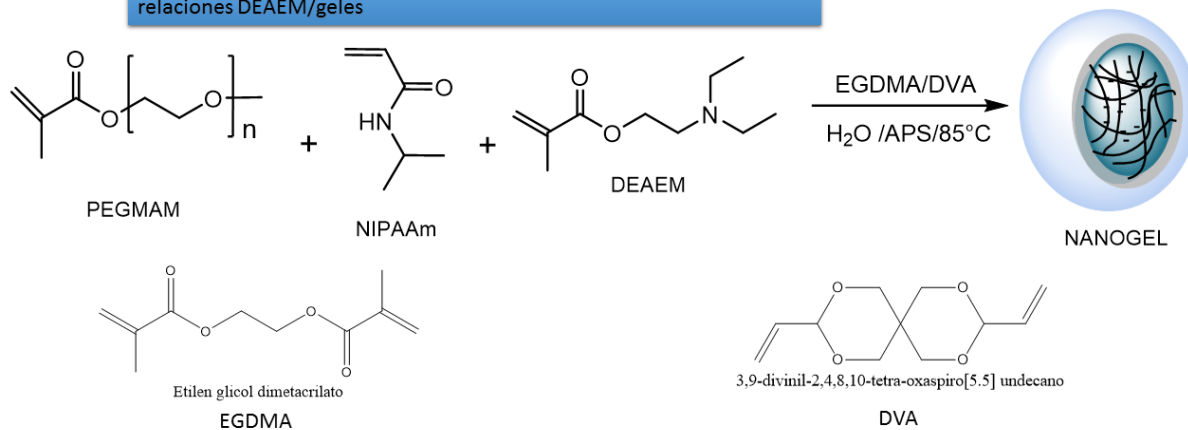


Figura 4. Reacción de polimerización

IV.1.3. Caracterización de los nanogeles

Se determinó el rendimiento gravimétricamente. Se determinó el diámetro hidrodinámico de las partículas por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) utilizando el Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments), tanto de la solución original como de los nanogeles reconstituidas, para determinar su estabilidad al proceso de liofilización.

IV.1.4. El contenido de grupos ionizables se cuantificó mediante titulación ácido-base. 100 mg de nanogeles fueron dispersos en agua destilada. Se lea agregó HCl 0.1N hasta pH 2 y se retitulo con NaOH 0.05N hasta pH 12. El volumen equivalente se calculó entre los dos puntos de inflexión de la curva de retrotitulación.

IV.1.4 Cargado y liberación de 5-Fu.

1. Cargado de las nanogeles: Para el cargado de los nanogeles con fármaco se probó el método de emulsión. 4 g de nanogeles fueron dispersos en agua y 8 mg de 5Fu

fue disperso en cloroformo. Se añadió la solución de fármaco a la dispersión de nanogeles y se permitió que se evapore el disolvente orgánico. Posteriormente se liofilizaron las nanopartículas.

2. Determinación de la capacidad de carga de los nanogeles. Las nanopartículas cargadas fueron dispersas en amortiguador de fosfato pH 7.4 y agitadas por 24 h. Posteriormente fueron filtradas por filtro 0.2 micras. La concentración de fármaco en el filtrado se determinó por espectroscopía UV a 274 nm usando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU520. El cargado de fármaco fue calculado como $(\text{peso de fármaco}/\text{peso de nanogeles cargados}) \times 100$.
3. Estudios de liberación. La liberación se llevará a cabo a partir de una dispersión recién preparada de los nanogeles cargados, colocada dentro de una bolsa de diálisis, la cual se pondrá dentro del medio de liberación en un matraz con chaqueta para control de temperatura por recirculación de agua. Se usaron pinzas para bolsa de diálisis con barra magnética para agitar a 50 rpm usando un agitador magnético. En periodos predefinidos de tiempo se tomarán muestras del medio y se evaluará la concentración de fármaco en la solución por los métodos indicados anteriormente. variando el pH (7.4 y 5) y midiendo la concentración de las alícuotas extraídas por espectroscopía UV.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.11 Síntesis de Polímeros biocompatibles con núcleo catiónico

I.11.1 Síntesis de nanogeles entrecruzados con EDGMA y DVA

En el ensayo preliminar para el estudio de la formación de nanogeles, se obtuvieron diferentes dispersiones; el producto se observó como un líquido semitransparente azulado como se observa en la Figura 5. Estas dispersiones se caracterizaron vía DLS, para analizar el tamaño de partícula con el diámetro hidrodinámico (Dh); estos resultados se pueden observar en la Tabla 4. Formulaciones F1 a F3 corresponden a los nanogeles entrecruzados con EDGMA, mientras que las formulaciones F4 a F6 corresponden a las formulaciones con entrecruzados con DVA.



Figura 5. Reacción de polimerización finalizada.

Tabla 4. Diámetros hidrodinámicos y formulaciones.

Formulación	Proporción NIPAAm:PEGMEM	DEAEMA%	Tamaño (nm)
F1	70:30	5	519.8
F2	54:46	5	113.5
F3	54:46	10	172.6
F4	54:46	15	165.3
F5	54:46	5	59.84
F6	54:46	10	85.61
F7	54:46	15	54.30

En el análisis de las dispersiones, se obtuvieron gráficas con una sola distribución de tamaños con el porcentaje en intensidad, los nanogeles entrecruzados con DVA presentan un menor Dh, en comparación con los nanogeles entrecruzados con EDGMA, esto ya se había reportado previamente por nuestro grupo (Figura 6).

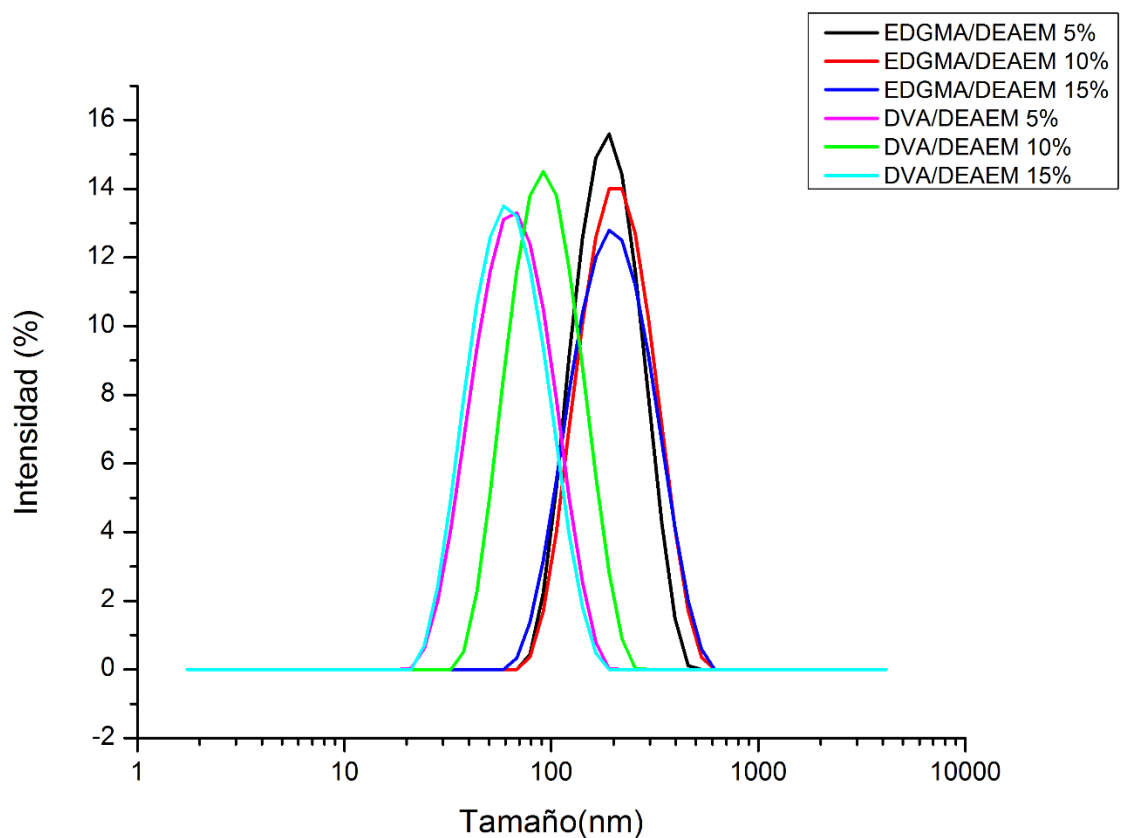


Figura 6. Distribución de tamaños por intensidad de los nanogeles entrecruzados con diferentes entrecruzantes

V.1.3. Contenido de grupos amino en los nanogeles sintetizados

Se calcularon los porcentajes reales de DEAEMA utilizados en la reacción con la siguiente fórmula haciendo un comparativo con los porcentajes teóricos, los resultados se encuentran en la tabla 5:

$$\%DEAEMA = \frac{\Delta V(mL)(NNaOH)(PM\ DEAEMA)}{Wmuestra} \times 100$$

Tabla 5. Composiciones de nanogeles y porcentajes DEAEMA

COMPOSICION	%REAL	%TEORICO
DEAEMA 10%/EDGMA	16.85	7.74
DEAEMA 15%/EDGMA	23.69	11.18
DEAEMA 5%/DVA	7.002	3.91
DEAEMA 10%/DVA	17.08	7.53

También se calculó el rendimiento de las seis reacciones, los resultados están descritos en la Tabla 6. Se utilizó la siguiente formula.

$$\%Rendimiento = \frac{W_{real}}{W_{teorico}} \times 100$$

Tabla 6. Porcentaje de rendimientos de las reacciones

COMPOSICION	% RENDIMIENTO
DEAEMA 5%/EDGMA	16.48
DEAEMA 10%/EDGMA	42.11
DEAEMA 15%/EDGMA	22.01
DEAEMA 5%/DVA	37.03
DEAEMA 10%/DVA	18.59
DEAEMA 15%/DVA	42.35

I.11.2 V.1.3. Efecto de la temperatura y el pH en el tamaño de los nanogeles sintetizados.

En las Figuras 7 a la 9 podemos apreciar los efectos de la temperatura en el tamaño de partícula a diferentes valores de pH. En algunas de las gráficas

encontramos que no se observa una transición en la temperatura debido a que tienden a agregarse ya que en los amortiguadores donde están disueltas las nanopartículas contienen sales y eso provoca la inestabilidad de los geles. Esto ocurre a pH 3 y 15% de DEAEM. Probablemente la agregación ocurre por la interacción del grupo amino ionizado y los grupos aniónicos del iniciador. Otra observación es que la temperatura de transición no incrementa a pH 3 como se esperaría de la ionización de los grupos amina. Por lo contrario la temperatura de transición disminuye a pH 3. Este fenómeno también puede ser atribuido a la interacción de los grupos amino catiónicos con los grupos aniónicos del iniciador.

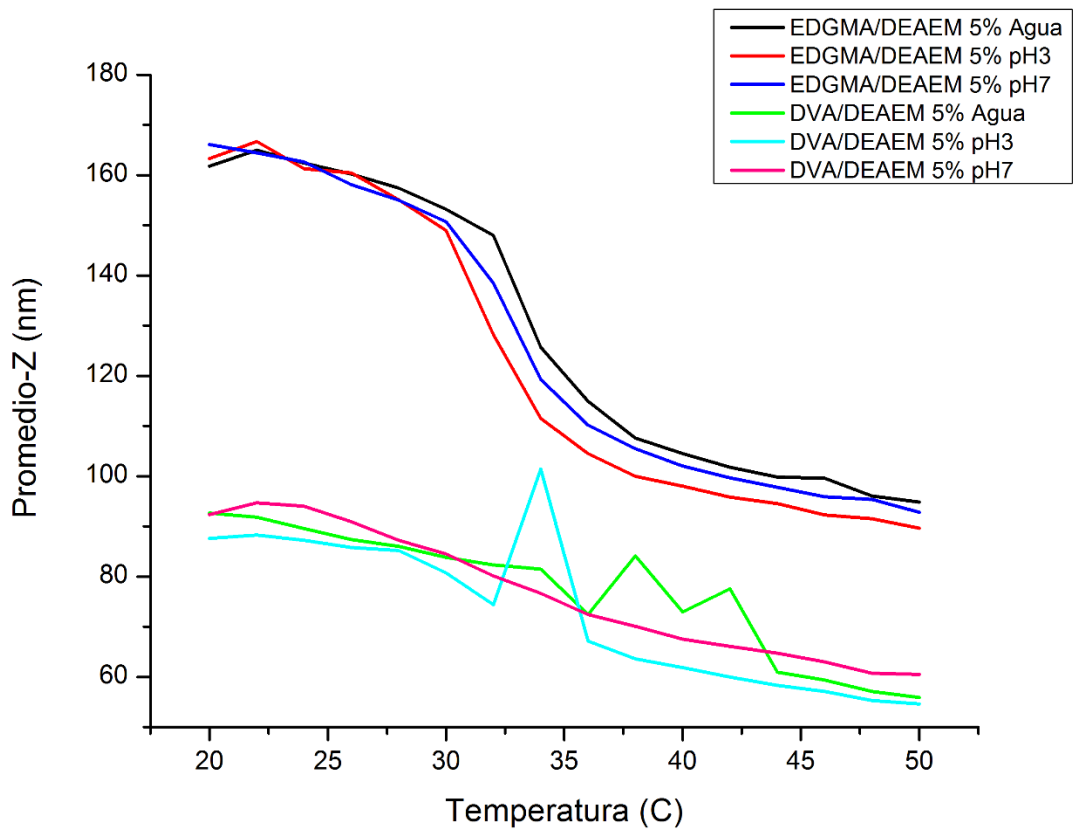


Figura 7. Efecto de temperatura y pH en el tamaño de nanogeles NIPAAm/PEGMEM 54:46 con 5% de DEAEM.

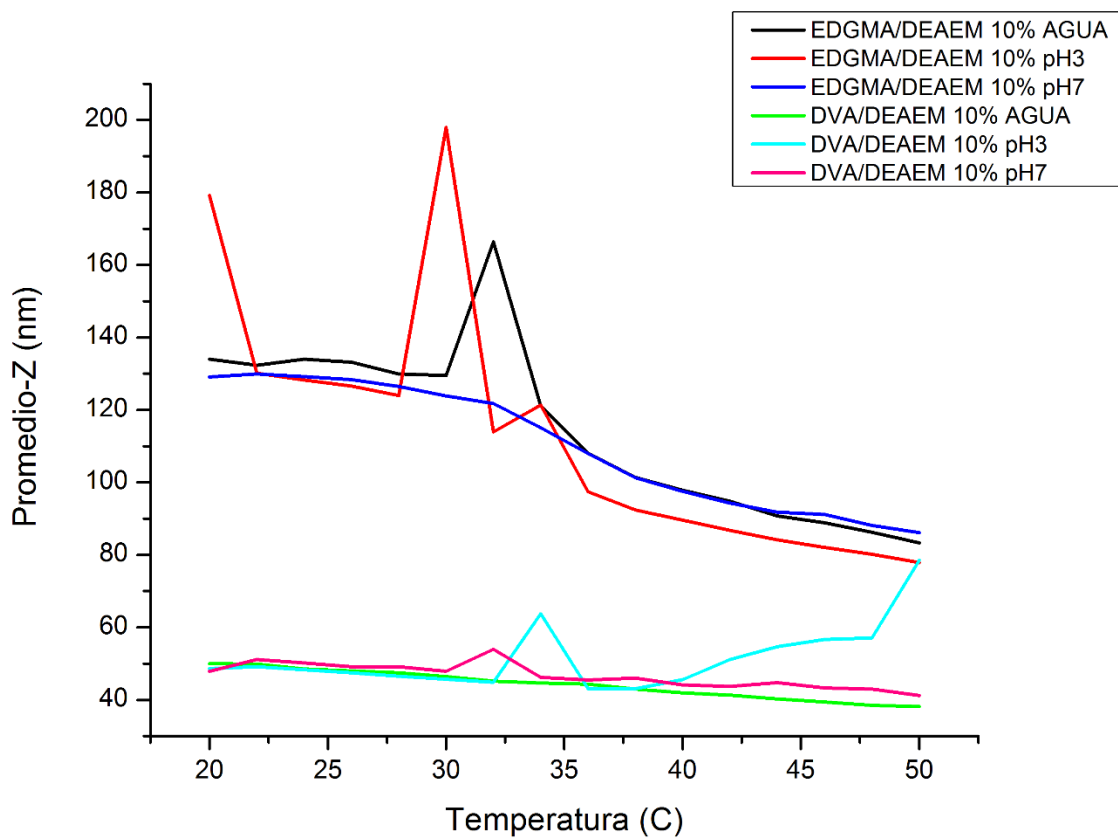


Figura 8. Efecto de temperatura y pH en el tamaño de nanogeles NIPPAm/PEGMEM 54:46 con 10% de DEAEM.

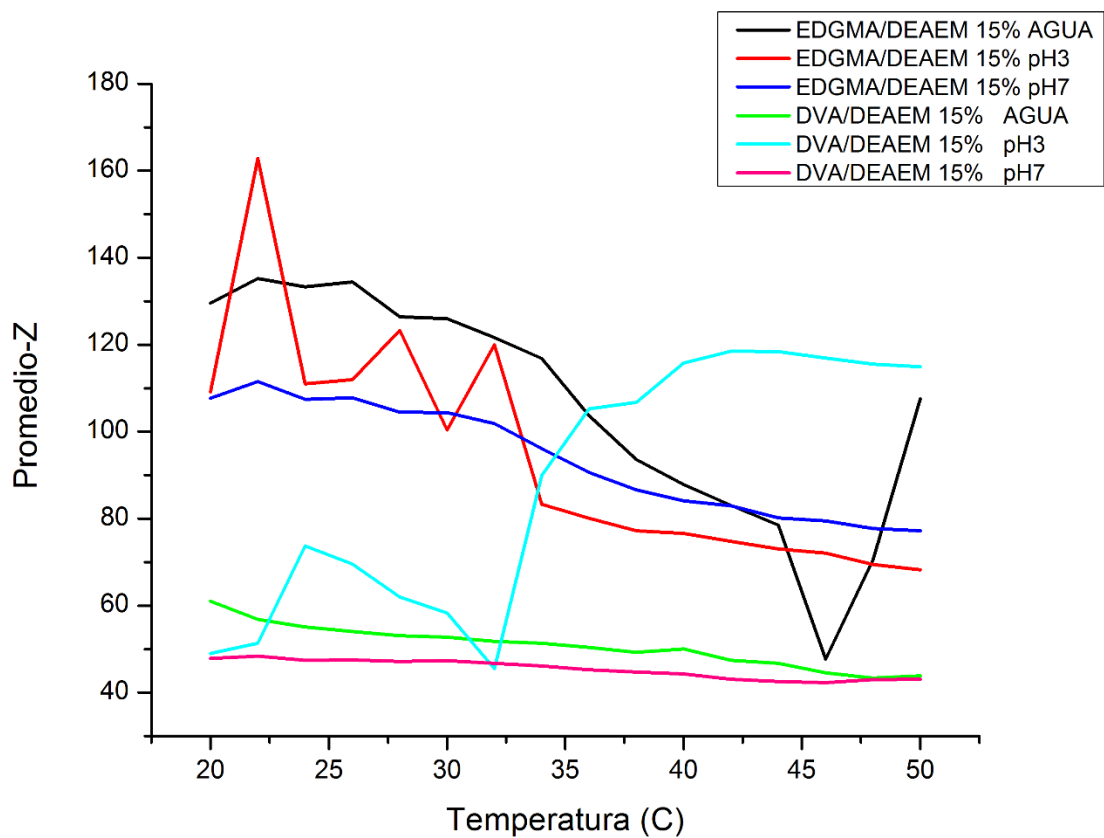


Figura 9. Efecto de temperatura y pH en el tamaño de nanogeles NIPPAm/PEGMEM 54:46 con 15% de DEAEM.

I.11.3 Efecto del tiempo y el pH en la estabilidad de los nanogeles sintetizados.

En las Figuras 10 a la 15 se observa efecto del tiempo en el PDI de las diferentes partículas sintetizadas. Este análisis se realiza para determinar si ocurre o no hidrólisis de las nanopartículas lo cual se expresa como un incremento en la distribución de las misma. Al analizar las figuras de los PDI's no se observa tendencia alguna para las entrecruzadas con EDGMA. Sin embargo, se observa una tendencia a incrementar el PDI para las nanopartículas entrecruzadas con DVA un entrecruzante conocido por ser inestable en medio ácido.

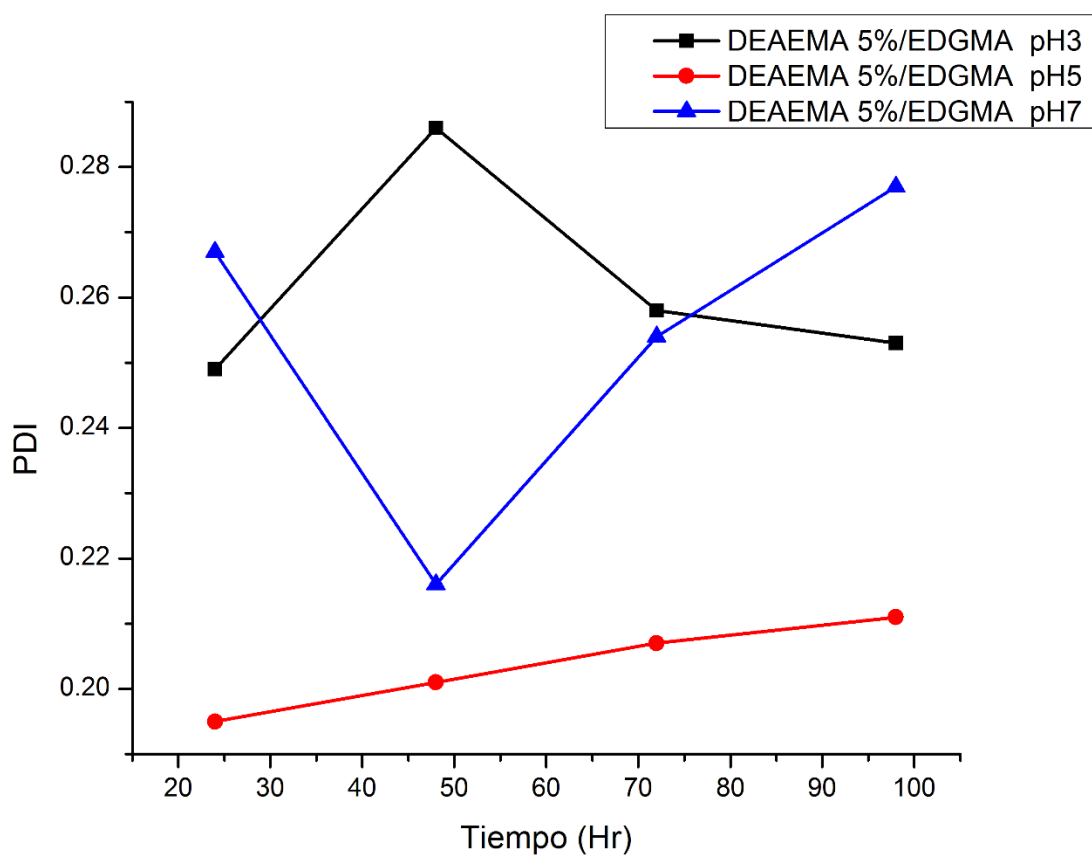


Figura 10. PDI F1 NIPAAm: PEGMAM, DEAEMA 5%/ EDGMA

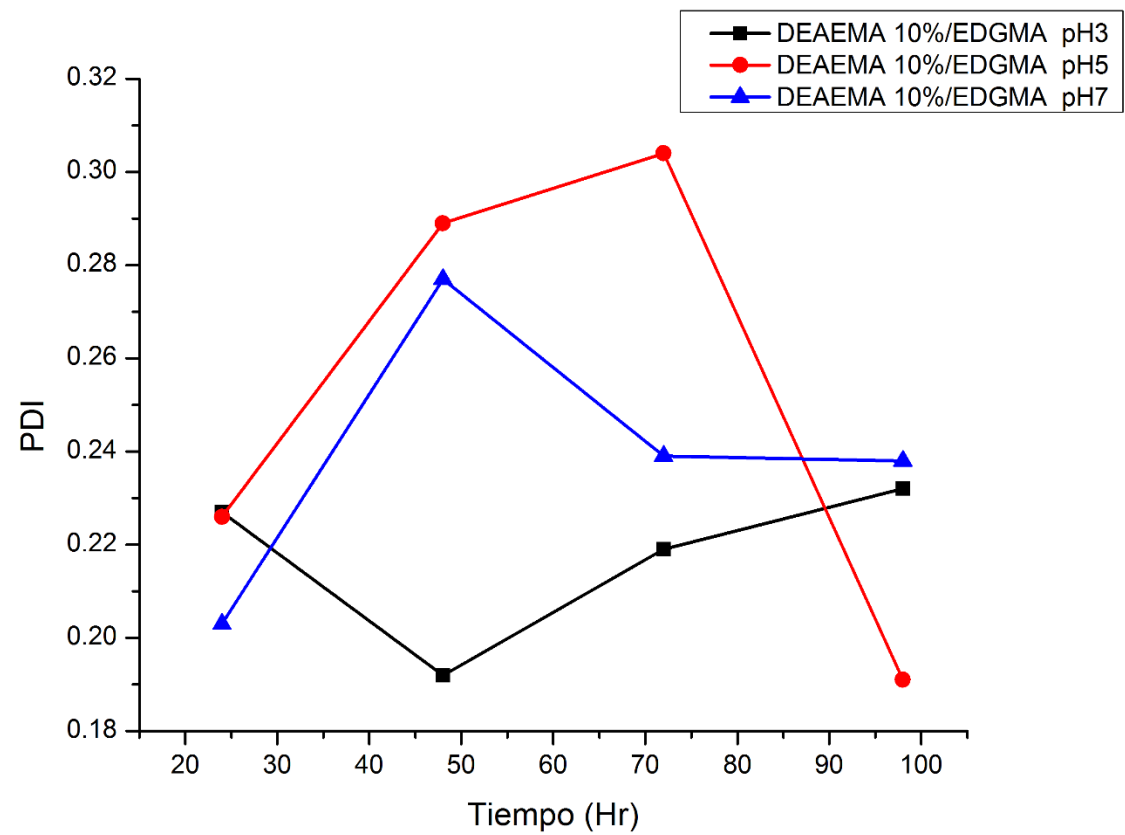


Figura 11. PDI F2 NIPAAm: PEGMAM, DEAEMA 10%/ EDGMA

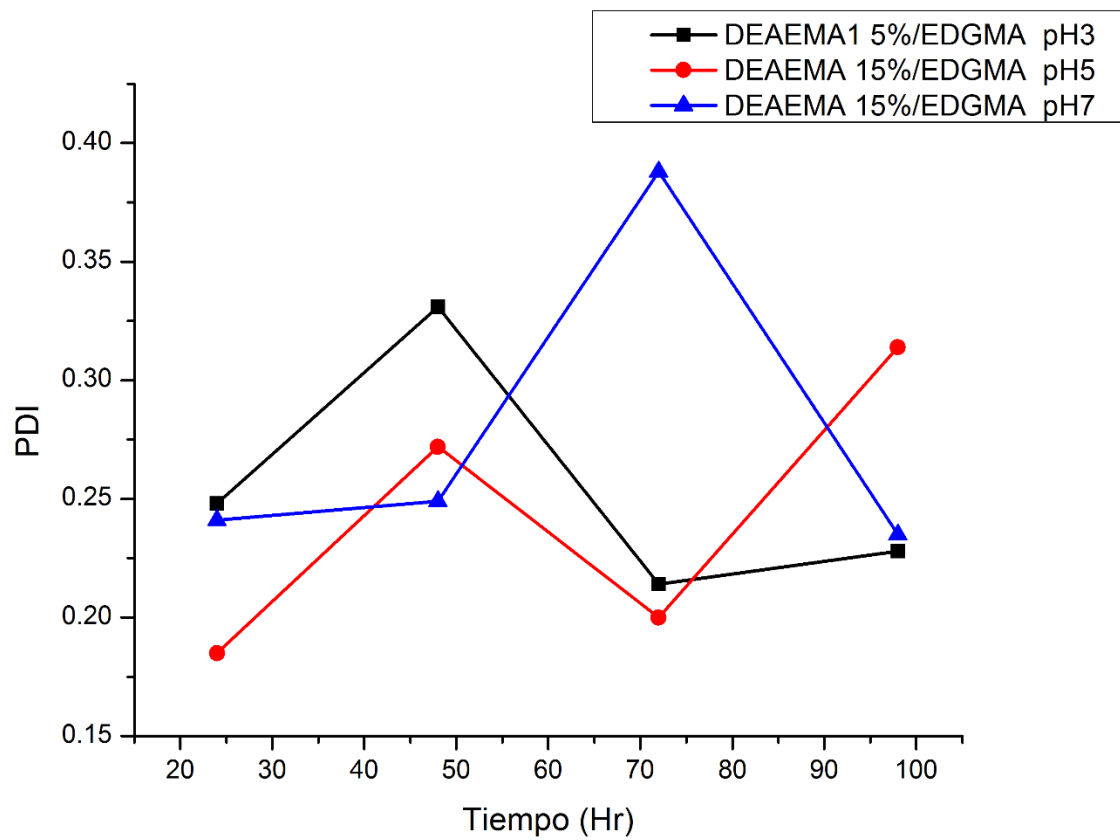


Figura 12. PDI F3 NIPAAm: PEGMEM, DEAEEMA 15%/ EDGMA

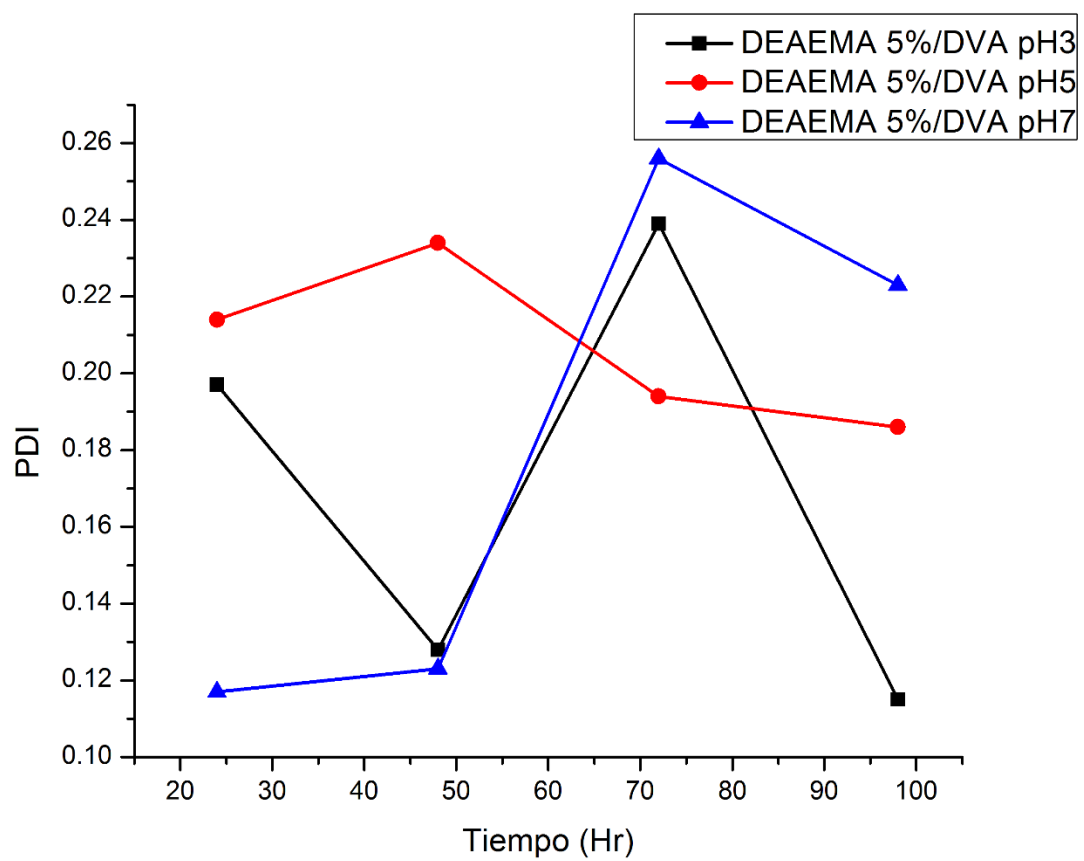


Figura 13. PDI F4 NIPAAm: PEGMAM, DEAEMA 5%/ DVA

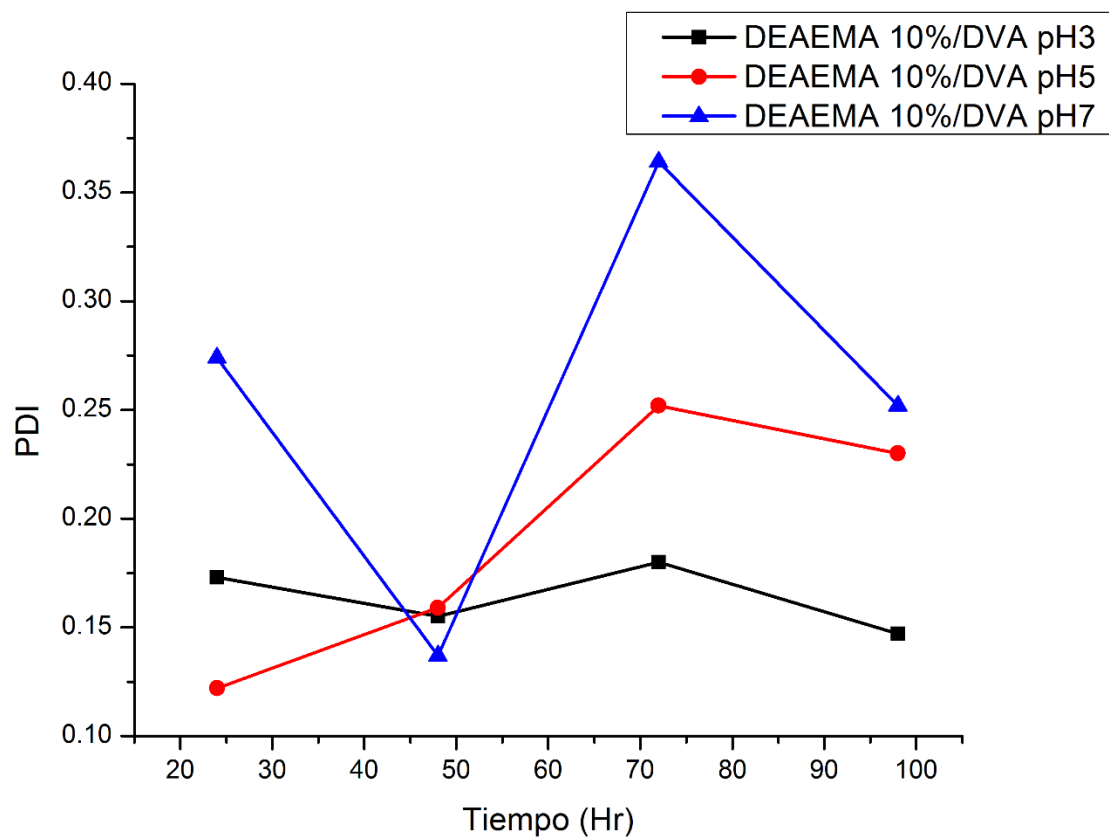


Figura 14. PDI F5 NIPAAm: PEGMEM, DEAEEMA 10%/ DVA

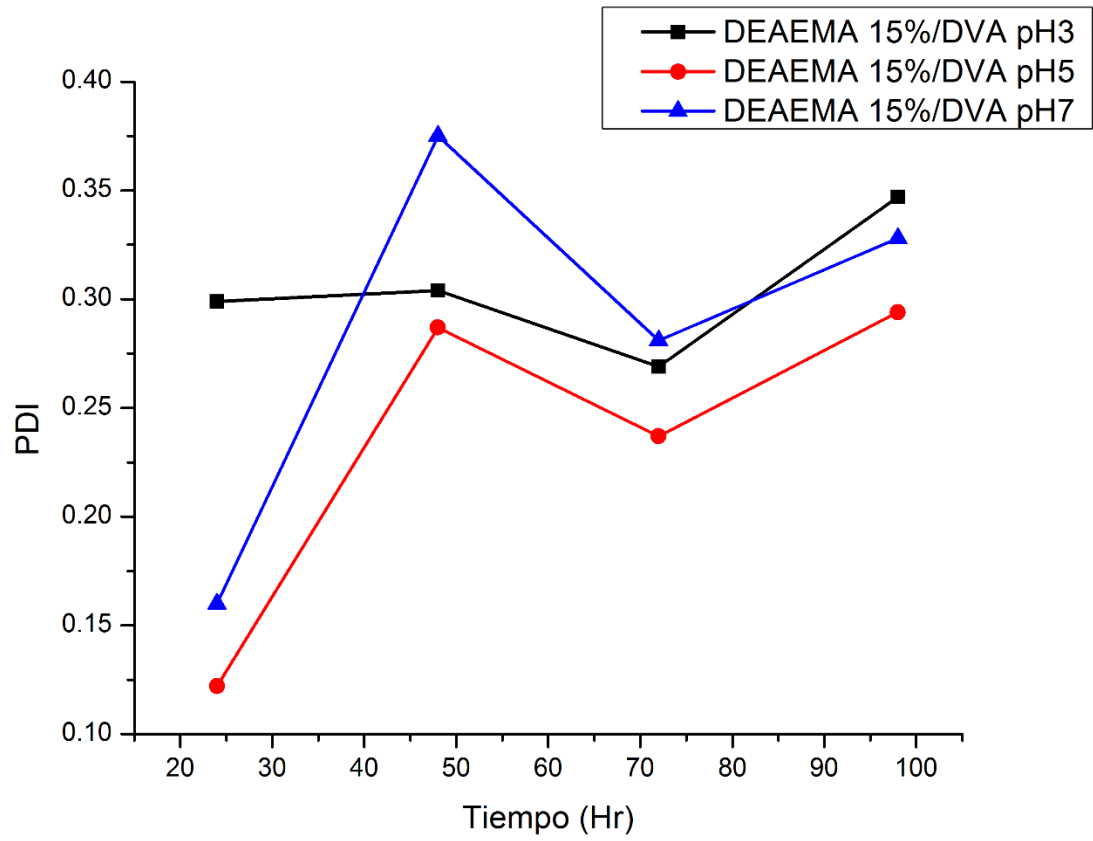


Figura 15. PDI F6 NIPAAm: PEGMEM, DEAEMA 15%/ DVA

V.1.4 Cargado y liberación de fármaco

Se determinó el cargado de fármaco lográndose un cargado de 56.6% para los nanogeles NIPAAm/DMEAM 85/15 entrecruzados con DVA y 53.58% para los geles entrecruzados con EDGMA.

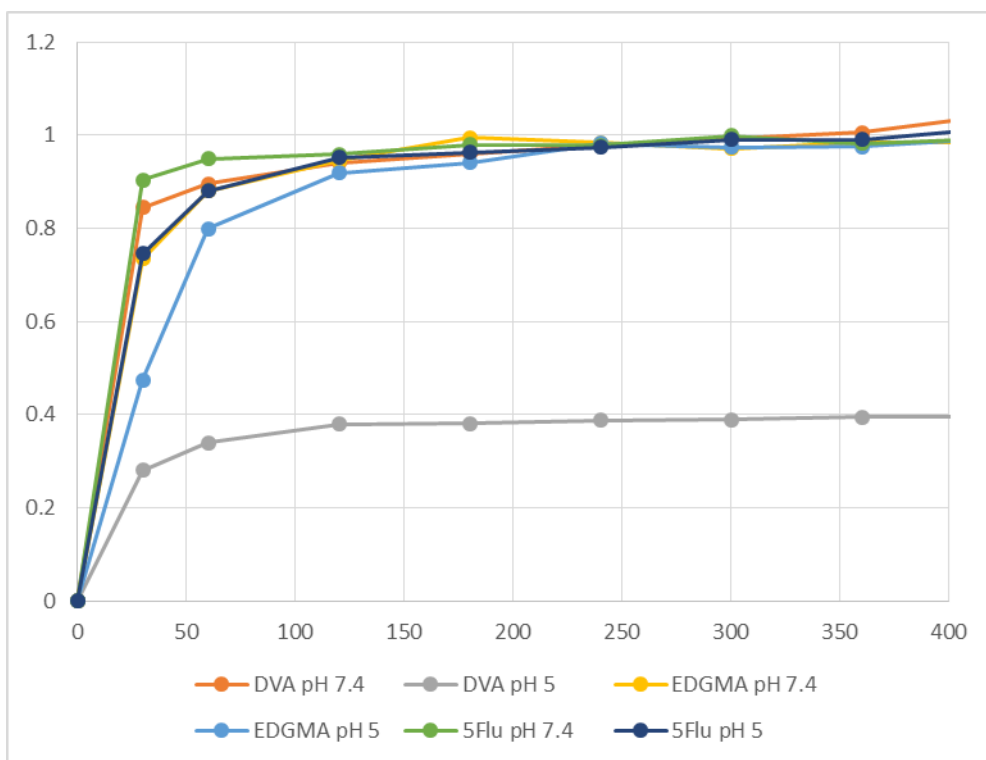


Figura 16. Cinética de liberación de 5-Flu a partir de los nanogeles cargados.

Los resultados de la Figura 16 indican que los nanogeles presentan un pobre control sobre la liberación de 5-Flu, excepto por los nanogeles entrecruzados con DVA a pH 5 donde se observa que solo el 40% del fármaco es liberado. El pobre control se puede deber al alto cargado obtenido de los nanogeles. Es necesario realizar estudios con cargados más bajos para asegurar que el hinchamiento de los nanogeles controla la liberación del fármaco.

VI. CONCLUSIONES

Se logró, mediante el control de las proporciones de NIPAAm y PEGMAM obtener nanogels con grupos amina y tamaño por debajo de los 200 nm, los cuales pueden tener una importante aplicación en nanomedicina. También se encontró que el DEAMEM tiene un ligero efecto en el tamaño de los nanogeles. Los materiales presentan una transición con la temperatura, sin embargo, su sensibilidad al pH es mínima dado que la temperatura de transición no se ve afectada por el pH. Esto puede ser debido a que a los pH a los cuales el grupo amino se ioniza, este interacciona con los grupos ionizados del persulfato, utilizado como iniciador.

De igual manera se observa que los nanogeles de DVA son relativamente estables a pH ácido, lo cual difiere significativamente de los nanogeles de NIPAAm que contienen grupos ácido, previamente estudiados. De igual manera atribuimos esta propiedad a la capacidad de formar interacciones iónicas entre los grupos ionizables, lo que estabiliza las partículas.

Los estudios de cargado y liberación de fármaco indican que los nanogeles tienen una alta capacidad para cargar 5-Flu. Sin embargo los nanogeles presentaron un pobre control de la liberación, probablemente debido a la alta carga de fármaco en los mismos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Kabanov AV, Vinogradov SV. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angew Chemie Int Ed*. 2009;48(30):5418-5429. doi:10.1002/anie.200900441.
2. Seymour LW, Duncan R, Strohalm J, Kopeček J. Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(11):1341-1358. doi:10.1002/jbm.820211106.
3. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci*. 2008;33(4):448-477. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.01.002.
4. Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:37-48. doi:10.1016/j.addr.2012.09.013.
5. Vinogradov S V. Colloidal microgels in drug delivery applications. *Curr Pharm Des*. 2006;12(36):4703-4712. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1764637&tool=pmcentrez&endertype=abstract>. Accessed February 5, 2016.
6. Vinogradov S V, Batrakova E V, Kabanov A V. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem*. 2004;15(1):50-60. doi:10.1021/bc034164r.
7. Mahmood I, Green MD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(4):331-347. doi:10.2165/00003088-200544040-00001.
8. Oishi M, Nagasaki Y. Synthesis, characterization, and biomedical applications of core-shell-type stimuli-responsive nanogels – Nanogel composed of poly[2-(N,N-diethylamino)ethyl methacrylate] core and PEG tethered chains. *React Funct Polym*. 2007;67(11):1311-1329. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2007.07.009.
9. Trubetskoy V. Polymeric micelles as carriers of diagnostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;37(1-3):81-88. doi:10.1016/S0169-409X(98)00100-8.
10. Oishi M, Nagatsugi F, Sasaki S, Nagasaki Y, Kataoka K. Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotides containing acid-labile linkages. *Chembiochem*. 2005;6(4):718-725. doi:10.1002/cbic.200400334.
11. Hayashi H, Iijima M, Kataoka K, Nagasaki Y. pH-Sensitive Nanogel Possessing Reactive PEG Tethered Chains on the Surface. *Macromolecules*. 2004;37(14):5389-5396. doi:10.1021/ma049199g.
12. Sahiner N, Alb AM, Graves R, et al. Core-shell nanohydrogel structures as tunable delivery systems. *Polymer (Guildf)*. 2007;48(3):704-711. doi:10.1016/j.polymer.2006.12.014.
13. Rzaev ZMO, Dinçer S, Pişkin E. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Prog Polym Sci*. 2007;32(5):534-595. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.01.006.

14. GIL E, HUDSON S. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci.* 2004;29(12):1173-1222. doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.08.003.
15. Vihola H, Laukkanen A, Valtola L, Tenhu H, Hirvonen J. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam). *Biomaterials.* 2005;26(16):3055-3064. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.008.
16. 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 (Guildf).* 2005;46(23):10092-10101. doi:10.1016/j.polymer.2005.07.098.
17. Shi S, Kuroda S, Kubota H. Anomalous particles formed in two-stage soap-free emulsion polymerization of styrene on poly(2-acetoxyethyl methacrylate). *Colloid Polym Sci.* 2003;281(4):331-336. doi:10.1007/s00396-002-0773-1.
18. Bontha S, Kabanov A V, Bronich TK. Polymer micelles with cross-linked ionic cores for delivery of anticancer drugs. *J Control Release.* 2006;114(2):163-174. doi:10.1016/j.jconrel.2006.06.015.
19. Brazel CS, Peppas NA. Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *J Control Release.* 1996;39(1):57-64. doi:10.1016/0168-3659(95)00134-4.
20. Huang J, Wu XY. Effects of pH, salt, surfactant and composition on phase transition of poly(NIPAm/MAA) nanoparticles. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 1999;37(14):2667-2676. doi:10.1002/(SICI)1099-0518(19990715)37:14<2667::AID-POLA42>3.0.CO;2-J.
21. Licea-Claverie A, Rogel-Hernández E, Salgado-Rodríguez R, et al. The use of hydrophobic spacers in the development of new temperature- and pH-sensitive polymers. *Macromol Symp.* 2004;207(1):193-216. doi:10.1002/masy.200450318.
22. Lugo-Medina E, Licea-Claverie A, Cornejo-Bravo JM, Arndt KF. Effect of method of preparation on properties of temperature and pH-sensitive gels: Chemical crosslinking versus irradiation with e-beam. *React Funct Polym.* 2007;67(1):67-80. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2006.09.003.
23. Leobandung W, Ichikawa H, Fukumori Y, Peppas NA. Monodisperse nanoparticles of poly(ethylene glycol) macromers and N-isopropyl acrylamide for biomedical applications. *J Appl Polym Sci.* 2003;87(10):1678-1684. doi:10.1002/app.11612.
24. 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 (Guildf).* 2004;45(26):9019-9022. doi:10.1016/j.polymer.2004.10.031.
25. Arias JL. Novel Strategies to Improve the Anticancer Action of 5-Fluorouracil by Using Drug Delivery Systems. *Molecules.* 2008;13(10):2340-2369. doi:10.3390/molecules13102340.
26. Wen H, Park K, eds. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. doi:10.1002/9780470640487.

27. Yun YH, Lee BK, Park K. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *J Control Release*. 2015;219:2-7. doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.005.
28. Birrenbach G, Speiser PP. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci*. 1976;65(12):1763-1766. doi:10.1002/jps.2600651217.
29. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):21-23. doi:10.1016/j.addr.2012.04.010.
30. Arshady R. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey. *Colloid Polym Sci*. 1992;270:717-732. doi:10.1007/BF00776142.
31. Priya James H, John R, Alex A. Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(2):120-127. doi:10.1016/j.apsb.2014.02.005.
32. Hoffman AS, Stayton PS, Bulmus V, et al. Founder's Award, Society for Biomaterials. Sixth World Biomaterials Congress 2000, Kamuela, HI, May 15-20, 2000. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):577-586. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<577::AID-JBM1>3.0.CO;2-5.
33. Kikuchi A, Okano T. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci*. 2002;27(6):1165-1193. doi:10.1016/S0079-6700(02)00013-8.
34. Ward MA, Georgiou TK. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1215-1242. doi:10.3390/polym3031215.
35. Al-Tahami K, Singh J. Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2007;1(1):65-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075875>. Accessed March 17, 2016.
36. Kumar A, Srivastava A, Galaev IY, Mattiasson B. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Prog Polym Sci*. 2007;32(10):1205-1237. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.003.
37. Bawa P, Pillay V, Choonara YE, du Toit LC. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomed Mater*. 2009;4(2):22001. doi:10.1088/1748-6041/4/2/022001.
38. Díez-Peña E, Quijada-Garrido I, Barrales-Rienda J. On the water swelling behaviour of poly(N-isopropylacrylamide) [P(N-iPAAm)], poly(methacrylic acid) [P(MAA)], their random copolymers and sequential interpenetrating polymer networks (IPNs). *Polymer (Guildf)*. 2002;43(16):4341-4348. doi:10.1016/S0032-3861(02)00270-7.
39. Varga I, Gilányi T, Mészáros R, Filipcsei G, Zrínyi M. Effect of Cross-Link Density on the Internal Structure of Poly(N -isopropylacrylamide) Microgels. *J Phys Chem B*. 2001;105(38):9071-9076. doi:10.1021/jp004600w.
40. Singh S, Webster DC, Singh J. Thermosensitive polymers: Synthesis, characterization, and delivery of proteins. *Int J Pharm*. 2007;341(1-2):68-77. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.03.054.

41. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(SUPPL.):154-162. doi:10.1016/j.addr.2012.09.012.
42. Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;53(3):321-339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744175>.
43. Choi S, Baudys M, Kim SW. Control of Blood Glucose by Novel GLP-1 Delivery Using Biodegradable Triblock Copolymer of PLGA-PEG-PLGA in Type 2 Diabetic Rats. *Pharm Res.* 2004;21(5):827-831. doi:10.1023/B:PHAM.0000026435.27086.94.
44. Ruel-Gariépy E, Leroux JC. In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):409-426. doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.019.
45. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(15):1655-1670. doi:10.1016/j.addr.2006.09.020.
46. Chan A, Orme RP, Fricker RA, Roach P. Remote and local control of stimuli responsive materials for therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(4):497-514. doi:10.1016/j.addr.2012.07.007.
47. Peng C-L, Yang L-Y, Luo T-Y, et al. Development of pH sensitive 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanotechnology.* 2010;21(15):155103. doi:10.1088/0957-4484/21/15/155103.
48. Gohy J-F, Lohmeijer BGG, Varshney SK, et al. Stimuli-Responsive Aqueous Micelles from an ABC Metallo-Supramolecular Triblock Copolymer. *Macromolecules.* 2002;35(26):9748-9755. doi:10.1021/ma021175r.
49. Peng H, Stolwijk JA, Sun L-N, Wegener J, Wolfbeis OS. A nanogel for ratiometric fluorescent sensing of intracellular pH values. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(25):4246-4249. doi:10.1002/anie.200906926.
50. Oishi M, Sumitani S, Nagasaki Y. On-off regulation of ¹⁹F magnetic resonance signals based on pH-sensitive PEGylated nanogels for potential tumor-specific smart ¹⁹F MRI probes. *Bioconjug Chem.* 2007;18(5):1379-1382. doi:10.1021/bc7002154.
51. Hasegawa U, Nomura SM, Kaul SC, Hirano T, Akiyoshi K. Nanogel-quantum dot hybrid nanoparticles for live cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(4):917-921. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.228.
52. Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y, et al. Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor. *J Cell Physiol.* 2009;220(1):1-7. doi:10.1002/jcp.21760.
53. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem Rev.* 1999;99(11):3181-3198. doi:10.1021/cr940351u.
54. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release.* 2000;65(1-2):271-284. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699287>. Accessed March 10, 2016.

55. Chacko RT, Ventura J, Zhuang J, Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(9):836-851. doi:10.1016/j.addr.2012.02.002.
56. DeLorenzo RJ, Pellock JM, Towne AR, Boggs JG. Epidemiology of status epilepticus. *J Clin Neurophysiol.* 1995;12(4):316-325. doi:10.1097/00004691-199512040-00003.
57. Pang T, Hirsch LJ. Treatment of Convulsive and Nonconvulsive Status Epilepticus. *Curr Treat Options Neurol.* 2005;7(4):247-259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967088>. Accessed June 13, 2016.
58. Agarwal SK, Cloyd JC. Development of benzodiazepines for out-of-hospital management of seizure emergencies. *Neurol Clin Pract.* 2015;5(1):80-85. doi:10.1212/CPJ.0000000000000099.
59. Ivaturi V, Kriel R, Brundage R, Loewen G, Mansbach H, Cloyd J. Bioavailability of intranasal vs. rectal diazepam. *Epilepsy Res.* 2013;103(2-3):254-261. doi:10.1016/j.eplepsyres.2012.07.018.
60. Kälviäinen R. Intranasal therapies for acute seizures. *Epilepsy Behav.* 2015;49:303-306. doi:10.1016/j.yebeh.2015.04.027.
61. Kapoor M, Winter T, Lis L, Georg GI, Siegel RA. Rapid delivery of diazepam from supersaturated solutions prepared using prodrug/enzyme mixtures: toward intranasal treatment of seizure emergencies. *AAPS J.* 2014;16(3):577-585. doi:10.1208/s12248-014-9596-5.
62. Siegel RA, Kapoor M, Cheryala N, Georg GI, Cloyd JC. Water-soluble benzodiazepine prodrug/enzyme combinations for intranasal rescue therapies. *Epilepsy Behav.* 2015;49:347-350. doi:10.1016/j.yebeh.2015.05.004.
63. Kapoor M, Siegel RA. Prodrug/Enzyme Based Acceleration of Absorption of Hydrophobic Drugs: An *in Vitro* Study. *Mol Pharm.* 2013;10(9):3519-3524. doi:10.1021/mp400272m.
64. Hou H, Siegel RA. Enhanced permeation of diazepam through artificial membranes from supersaturated solutions. *J Pharm Sci.* 2006;95(4):896-905. doi:10.1002/jps.20600.
65. Ivaturi VD, Riss JR, Kriel RL, Cloyd JC. Pharmacokinetics and tolerability of intranasal diazepam and midazolam in healthy adult volunteers. *Acta Neurol Scand.* 2009;120(5):353-357. doi:10.1111/j.1600-0404.2009.01170.x.
66. Kaur P, Kim K. Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. *Int J Pharm.* 2008;364(1):27-35. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.030.
67. Yao J, Hou L, Zhou JP, Zhang ZQ, Sun L. Preparation of lorazepam-loaded microemulsions for intranasal delivery and its pharmacokinetics.
68. Ratner BD (Buddy D. *Biomaterials Science an Introduction to Materials in Medicine.* Academic Press; 2013.

69. Banerjee I, Pangule RC, Kane RS. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater.* 2011;23(6):690-718. doi:10.1002/adma.201001215.
70. Ikada Y. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials.* 1994;15(10):725-736. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986935>. Accessed June 18, 2016.
71. Nuzzo RG. Biomaterials: Stable antifouling surfaces. *Nat Mater.* 2003;2(4):207-208. doi:10.1038/nmat872.
72. Blaszykowski C, Sheikh S, Thompson M, et al. Surface chemistry to minimize fouling from blood-based fluids. *Chem Soc Rev.* 2012;41(17):5599. doi:10.1039/c2cs35170f.
73. Zhai L, Cebeci FÇ, Cohen RE, Rubner MF. Stable Superhydrophobic Coatings from Polyelectrolyte Multilayers. *Nano Lett.* 2004;4(7):1349-1353. doi:10.1021/nl049463j.
74. Shivapooja P, Wang Q, Orihuela B, Rittschof D, López GP, Zhao X. Bioinspired Surfaces with Dynamic Topography for Active Control of Biofouling. *Adv Mater.* 2013;25(10):1430-1434. doi:10.1002/adma.201203374.
75. Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein. *Langmuir.* 2001;17(18):5605-5620. doi:10.1021/la010384m.
76. Chang Y, Liao S-C, Higuchi A, Ruaan R-C, Chu C-W, Chen W-Y. A Highly Stable Nonbiofouling Surface with Well-Packed Grafted Zwitterionic Polysulfobetaine for Plasma Protein Repulsion. *Langmuir.* 2008;24(10):5453-5458. doi:10.1021/la800228c.
77. Chang Y, Liao S-C, Higuchi A, Ruaan R-C, Chu C-W, Chen W-Y. A Highly Stable Nonbiofouling Surface with Well-Packed Grafted Zwitterionic Polysulfobetaine for Plasma Protein Repulsion. *Langmuir.* 2008;24(10):5453-5458. doi:10.1021/la800228c.
78. Jiang S, Cao Z. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Adv Mater.* 2010;22(9):920-932. doi:10.1002/adma.200901407.
79. Yang W, Zhang L, Wang S, White AD, Jiang S. Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly(carboxybetaine) in undiluted blood serum. *Biomaterials.* 2009;30(29):5617-5621. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.036.
80. Andrea R. Statz ‡, Robert J. Meagher †, Annelise E. Barron † and, Phillip B. Messersmith* ‡. New Peptidomimetic Polymers for Antifouling Surfaces. 2005. doi:10.1021/JA0522534.
81. Shengfu Chen, Jie Zheng, Lingyan Li and, Jiang* S. Strong Resistance of Phosphorylcholine Self-Assembled Monolayers to Protein Adsorption: Insights into Nonfouling Properties of Zwitterionic Materials. 2005. doi:10.1021/JA054169U.
82. Yoshimoto K, Hirase T, Madsen J, Armes SP, Nagasaki Y. Non-Fouling Character of Poly[2-(methacryloyloxy)ethyl Phosphorylcholine]-Modified Gold Surfaces Fabricated by the “Grafting to” Method: Comparison of its Protein Resistance with Poly(ethylene glycol)-Modified Gold Surfaces. *Macromol Rapid Commun.* 2009;30(24):2136-2140.

doi:10.1002/marc.200900484.

83. Prime KL, Whitesides GM. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 1993;115(23):10714-10721. doi:10.1021/ja00076a032.
84. Cao L, Sukavaneshvar S, Ratner BD, Horbett TA. Glow discharge plasma treatment of polyethylene tubing with tetraglyme results in ultralow fibrinogen adsorption and greatly reduced platelet adhesion. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(4):788-803. doi:10.1002/jbm.a.30908.
85. Hucknall A, Rangarajan S, Chilkoti A. In Pursuit of Zero: Polymer Brushes that Resist the Adsorption of Proteins. *Adv Mater.* 2009;21(23):2441-2446. doi:10.1002/adma.200900383.
86. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):18488-18501. doi:10.3390/ijms140918488.
87. Magin CM, Cooper SP, Brennan AB. Non-toxic antifouling strategies. *Mater Today.* 2010;13(4):36-44. doi:10.1016/S1369-7021(10)70058-4.
88. Yu Q, Zhang Y, Wang H, Brash J, Chen H. Anti-fouling bioactive surfaces. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1550-1557. doi:10.1016/j.actbio.2010.12.021.
89. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer : Polycaprolactone in the 21st century. *Fac Built Environ Eng Inst Heal Biomed Innov.* 2010.
90. Sisson AL, Ekinici D, Lendlein A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polymer (Guildf).* 2013;54(17):4333-4350. doi:10.1016/j.polymer.2013.04.045.
91. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000;21:2335-2346.
92. Dash TK, Konkimalla VB. Polymeric Modification and Its Implication in Drug Delivery: Poly- ϵ -caprolactone (PCL) as a Model Polymer. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2365-2379. doi:10.1021/mp3001952.
93. Williamson MR, Adams EF, Coombes AGA. Gravity spun polycaprolactone fibres for soft tissue engineering: Interaction with fibroblasts and myoblasts in cell culture. *Biomaterials.* 2006;27:1019-1026. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.018.
94. Lubomír Lapčík J. and, Lapčík L, Stefaan De Smedt* §,Il and, Demeester§ J, Chabreček P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications†. 1998. doi:10.1021/CR941199Z.
95. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):528-539. doi:10.1038/nrc1391.
96. Morra M, Cassineli C. Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1999;10(10):1107-1124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591135>. Accessed October 6, 2016.

97. Li L, Qian Y, Jiang C, et al. The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2012;33:3428-3445. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.038.
98. Ramadan MH, Prata JE, Karácsony O, Dunér G, Washburn NR. Reducing Protein Adsorption with Polymer-Grafted Hyaluronic Acid Coatings. *Langmuir*. 2014;30(25):7485-7495. doi:10.1021/la500918p.
99. George E. Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(11):637-640. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924202>. Accessed October 6, 2016.
100. Burns JW, Skinner K, Colt J, et al. Prevention of tissue injury and postsurgical adhesions by precoating tissues with hyaluronic acid solutions. *J Surg Res*. 1995;59(6):644-652. doi:10.1006/jsre.1995.1218.
101. Chen SH, Chen CH, Shalumon KT, Chen JP. Preparation and characterization of antiadhesion barrier film from hyaluronic acid-grafted electrospun poly(caprolactone) nanofibrous membranes for prevention of flexor tendon postoperative peritendinous adhesion. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):4079-4092. doi:10.2147/IJN.S67931.
102. Pravata L, Braud C, Boustta M, et al. New Amphiphilic Lactic Acid Oligomer-Hyaluronan Conjugates: Synthesis and Physicochemical Characterization. *Biomacromolecules*. 2008;9(1):340-348. doi:10.1021/bm700843m.

VIII. Anexos

I.12 Liberación intranasal de Diazepam

I.12.1 Introducción

Las benzodiacepinas (BZD), como el diazepam (DZP), lorazepam (LZP) y midazolam (MDZ) son fármacos de primera elección para el tratamiento de emergencias convulsivas en pacientes epilépticos. Estas situaciones de emergencia requieren la administración rápida de fármacos al cerebro, preferiblemente dentro de un intervalo de 5 a 10 Minde⁵⁶. Actualmente las emergencias convulsivas se tratan mediante LZP intravenoso (I.V) o DZP vía rectal⁵⁷. Sin embargo, para la administración I.V se debe acudir a la sala de emergencias de un hospital, la cual implica una serie de complicaciones tales como retrasos significativos por parte de la ambulancia, o la presencia de personal calificado para llevar a cabo la aplicación del fármaco, mientras que la vía rectal tuvo una mala aceptación social y el cumplimiento por parte del paciente.

Debido a las dificultades asociadas con la administración I.V y la administración rectal de las BZD, la vía intranasal recientemente ha atraído el interés⁵⁸⁻⁶³. Sin embargo, el volumen limitado que puede absorberse por las cavidades nasales del humano, demanda soluciones altamente concentradas de fármacos, que son difíciles de preparar y almacenar en medios acuosos debido a la muy baja solubilidad que presentan las BZD. Como resultado, han sido desarrolladas varias formulaciones nasales que contienen disolventes orgánicos y tensoactivos⁶⁴⁻⁶⁷. La introducción de estos aditivos orgánicos puede causar irritación y toxicidad potencial, las formulaciones acuosas serían preferibles en este caso.

Recientemente el equipo de trabajo del Dr. Siegel et al. Ha informado de un sistema de profármaco / enzima acuoso que puede permitir una rápida absorción intranasal de DZP. Se prepararon soluciones supersaturadas de fármaco in situ co-administradas el profármaco avizafone (AVF) y una enzima proteasa activadora proveniente del hongo *Aspergillus oryzae* (AO proteasa), en monocapas de células

Madin Darby de riñón canino tipo II-salvaje (MDCKII-wt), un modelo que se utiliza para simular el epitelio nasal. Estas mezclas profármaco-enzima exhiben una permeación varias veces más rápida, sin precipitación del fármaco, a través de las monocapas, en comparación con el DZP⁶¹ acuoso saturado. Sin embargo, la conversión de profármaco por la proteasa A.O es incompleta: se convirtió en más del 70-80% del AVF, con independencia de la relación de profármaco / enzima y el tiempo de reacción. Tras realizar investigaciones adicionales, la AVF utilizado en este estudio se demostró que era una mezcla racémica, que nos lleva a especular que la conversión por la enzima es estereoespecífica.

Se realizaron experimentos después de haber sintetizado AVF quiralmente pura y se compara su potencia con la mezcla de enantiómeros con respecto a la conversión enzimática y la permeabilidad del producto DZP través de la monocapa MDCKII-wt. También se sintetizó un profármaco quiralmente puro de MDZ, un fármaco más potente que DZP para el tratamiento de convulsiones emergencias. Sorprendentemente, este profármaco (MDZ-pro) fue también un sustrato para la conversión por A.O proteasa. La cinética de la enzima y en estudios in vitro de permeabilidad MDZ, de nuevo utilizando monocapas MDCKII-wt, se llevaron a cabo. Este trabajo proporciona una base adicional para el desarrollo de sistemas de profármaco / enzima acuosa para la administración intranasal de las BZD poco solubles.

I.13 Protocolos

I.13.1 Cultivo Celular

Preparación de medios de cultivo celular: 500 ml de DMEM + 50 ml 10% de FBS + 1 ml antibióticos (100 mg / ml de estreptomycin, penicilina 100 U / ml y 250 ng / ml de anfotericina B); Poner los medios de cultivo ya preparado en un tubo falcon de 50 ml para el uso frecuente del mismo.

- Recipiente de cultivo celular: Frasco de cultivo T-25 (25 cm³) - 8 ml de medio es el volumen máximo permitido, por lo que pusieron 7 ml; Los frascos de cultivo T-75 pueden contener como máximo 12 mL de medio.
- Incubadora para cultivo celular debe estar a 37 ° C y con una atmósfera de CO₂ al 5%.
- Campana estéril: Es necesario encender la luz UV unos 15 a 20 minutos antes de iniciar con el cultivo celular; rociar el área de la ventana de trabajo con un etanol al 70%; rocíe todas las superficies de los objetos que entran en la campana con etanol al 70%; frascos celulares no tienen que ser limpiado con etanol.

Es necesario observar bajo microscopio diariamente los frascos de cultivo para verificar que las células se encuentren saludables y creciendo, así como para observar si no hay algún tipo de contaminación, las células estarán listas para el pase cuando lleguen a cubrir del 80 al 90% de la superficie del frasco de cultivo, a esto se le conoce como confluencia.

I.13.2 Pasaje de Células

Cómo pasar las células:

1. Entibiar el medio de cultivo celular en un tubo de 50 ml en baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Asegúrese de limpiar la superficie con etanol al 70% antes de introducirlo al interior de la campana estéril.
2. Drenar el medio de cultivo de los frascos utilizando una pipeta Pasteur desechable conectado a la aspiradora.
3. Tomar 5 mL de DPBS usando una pipeta de plástico estéril sobre el pipeteador automático. Asegúrese de que la punta no toque nada; Agitar gentilmente de forma que el tampón cubra toda el área del frasco de cultivo celular.
4. Aspirar el búfer del frasco de cultivo.
5. Añadir 1 ml de tripsina e incubar el matraz durante 30 minutos a 37 ° C y con una atmósfera de CO₂ al 5%.

6. Después del tiempo de incubación sacar los frascos de la incubadora, compruebe que el fondo del frasco este transparente, y que la solución este turbia con células flotando alrededor.
7. Destapar el tubo con medio de cultivo y tomar 10 mL.
8. Colocar 5 ml del medio de cultivo en el nuevo frasco primero (para no desechar la pipeta), y los 5 mL restantes en el frasco de cultivo celular viejo. Asegúrese de que la punta de la pipeta no toque nada.
9. Pipetear de arriba hacia abajo en el interior del matraz viejo varias veces, para parar la tripsina y de este modo las células queden lavadas.
10. Es probable que muchas de las células hayan muerto durante el proceso, para ello necesitamos diluir la solución de células para el nuevo matraz. Para ello realizaremos una dilución 1:10 o 1:20 según sea el número de células que necesitamos para los experimentos, es importante mantener siempre un matraz stock, que servirá como reserva en caso de que se llegue a contaminar las células para los experimentos.
11. Etiqueta el nuevo matraz con sus iniciales, número de pase, tipo de célula, dilución y la fecha.
12. Cierre bien la tapa del frasco nuevo.
13. Se incuba el matraz a 37 °C, 5% de CO₂. Rociar el interior de la puerta con un 70% de etanol antes de abrir la incubadora.
14. Tire la solución de células que queda en el frasco de cultivo en el vaso de residuos (o hacerlo directamente al siguiente paso).
15. Si el matraz de desechos está lleno, verter cloro al 15%. Si se trata de un vaso de precipitados de residuos para ser reutilizado, lavar la superficie interior con cloro 15% y luego con jabón utilizando un cepillo.
16. Vaciar los residuos.
17. Asegúrese de limpiar el área y tirar todo en el bote de basura y lo que vaya al bote de residuos biológicos, las pipetas Pasteur de vidrio van en el bote para basura de vidrio.
18. Limpie la superficie de la campana estéril con 70% de etanol de nuevo.

19. Baje la tapa y apagar la luz después proceda a encender la luz UV.

20. Apagar la luz UV después de 30 minutos.

I.13.3 Ensayo de permeabilidad con amarillo lucifer

I.13.3.1 *Materiales:*

Amarillo lucifer (Mw 521.57)

I.13.3.2 *Preparación:*

Solución stock = 2,000 uM in pH 7.4 amortiguador de ensayo

= 1.04314 mg/mL (For 10 mL, 10.4314 mg)

Solución de Trabajo = 100 uM in pH 7.4 amortiguador de ensayo

($M_1V_1=M_2V_2$, 50 uL de la solución stock + 950 uL amortiguador de ensayo)

Tiempo de recolección de las muestras = 0, 15, 30, 60, 120 minutos (5, n=2 da un total de 10 muestras).

I.13.4 *Procedimiento:*

1. Adicionar 200 μ L de la solución de trabajo al pocillo deseado.
2. Llegado el tiempo de colección de la muestra, tomar 200 μ L del lado basal y reemplázalo con amortiguador fresco.
3. Tomar muestras de la parte apical a tiempo 0 y 120.
4. Para analizar las muestras utilizar un espectrofluorímetro.

I.13.5 *Medida de la integridad de la monocapa*

La evaluación de las características de permeabilidad de las células MDCKII-wt se puede realizar mediante la medición del paso pasivo de diferentes moléculas a través

de la monocapa. Los compuestos hidrofílicos más pequeñas cruzan la monocapa a través del espacio paracelular, tales como las uniones estrechas, y pueden considerarse como marcadores de paso para esta ruta. El marcador amarillo Lucifer fácilmente detectable. Se utiliza para comprobar la integridad de membrana y para determinar si la concentración de trabajo del compuesto de prueba altera la integridad de la monocapa. En este protocolo, el ensayo Amarillo Lucifer se lleva a cabo después del ensayo de resistencia transepitelial.

1. Materiales

1.1. Placas Transwell

1.2. Amortiguador B

1.3. mg/ml solución de amarillo Lucifer (Lucifer Yellow CH dipotassium salt, Cat. No. L0144) en Buffer B

1.4. Placa de 96 pocillos

1.5. Lector multiplacas de fluorescencia.

2. Realizar ensayo Amarillo Lucifer

2.1. Después de retirar las muestras para el análisis, aspirar el líquido restante de los pozos apical y basal.

2.2. Adicionar 500 µl de la solución de amarillo lucifer a 0.1 mg/ml a la parte apical del pocillo y 1,000 µL of buffer B a la basal del pocillo.

2.3. Incubar a 37 °C por 60 minutos.

2.4. Transferir 150 µl de la parte basal a una placa de 96 pocillos y leer en un espectrofluorímetro a una excitación de 485 nm y la emisión debe ser a 535 nm. También medir la fluorescencia de tampón B (en blanco) y 0,1 mg / ml Solución amarillo Lucifer. Calcular el porcentaje de permeabilidad tomando los valores de fluorescencia como lo indica la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Permeabilidad} = \frac{\text{muestra} - \text{Blanco}}{\text{Amarillo Lucifer} - \text{Blanco}} \times 100$$

La permeabilidad será aceptable si es <3%.

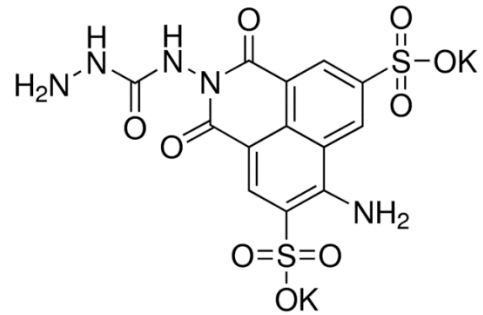


Figura 17. Amarillo Lucifer, sal dipotásica



Figura 18. Voltohmmetro Epitelial

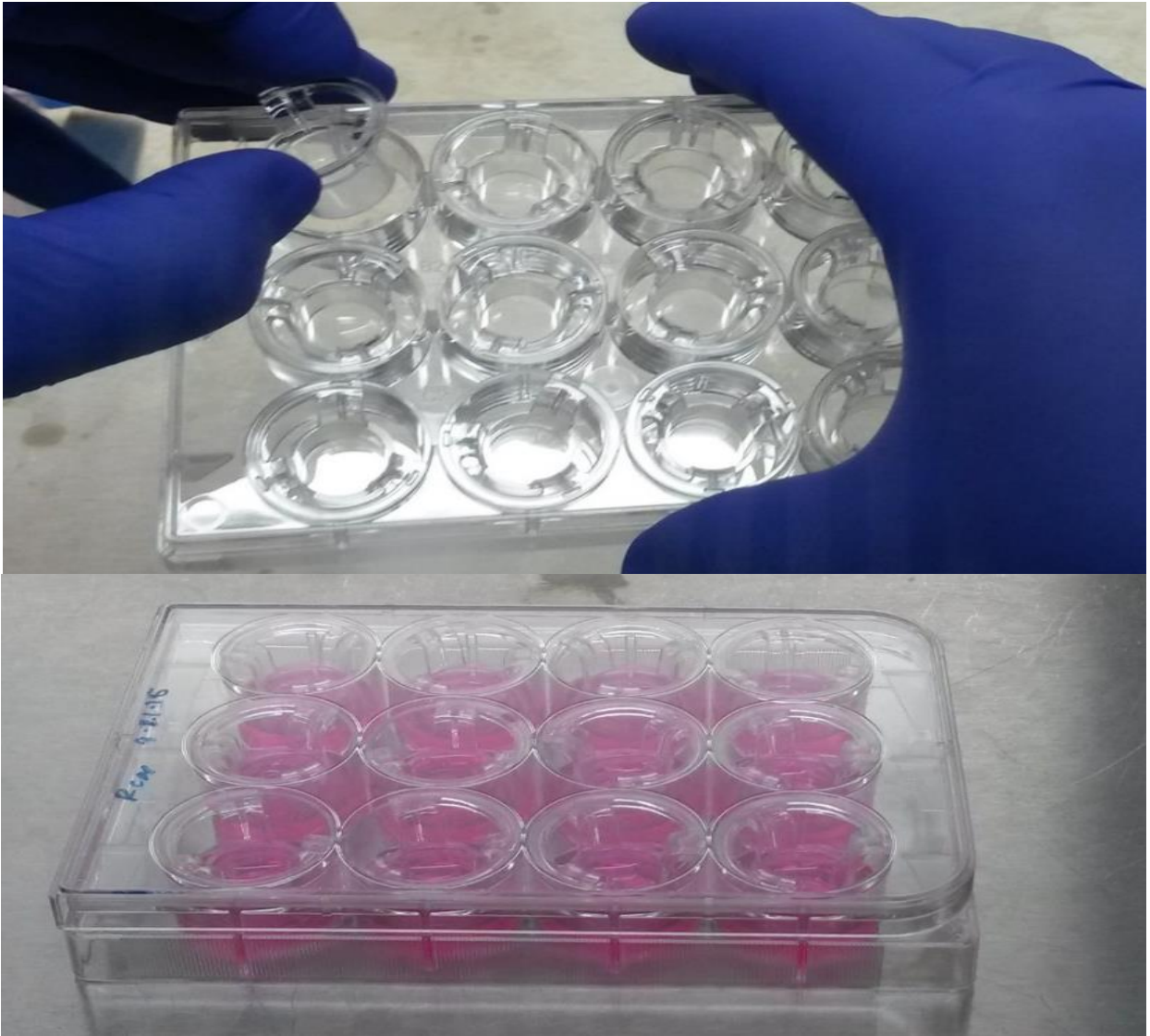
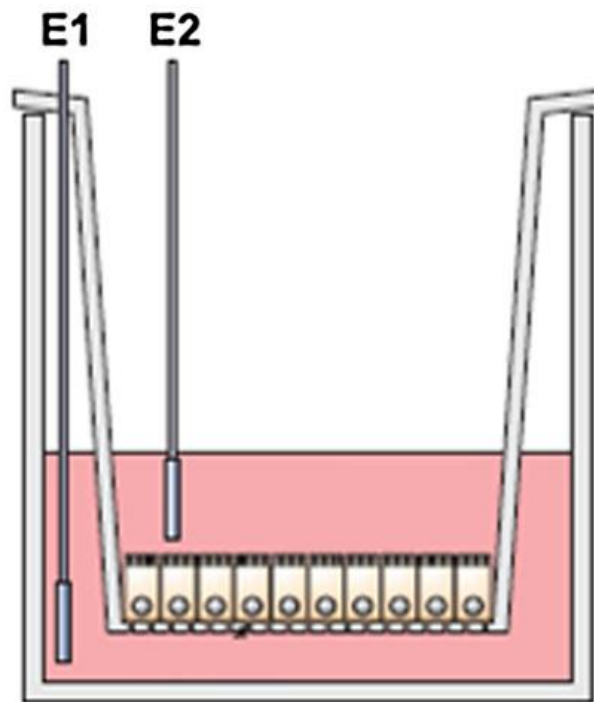
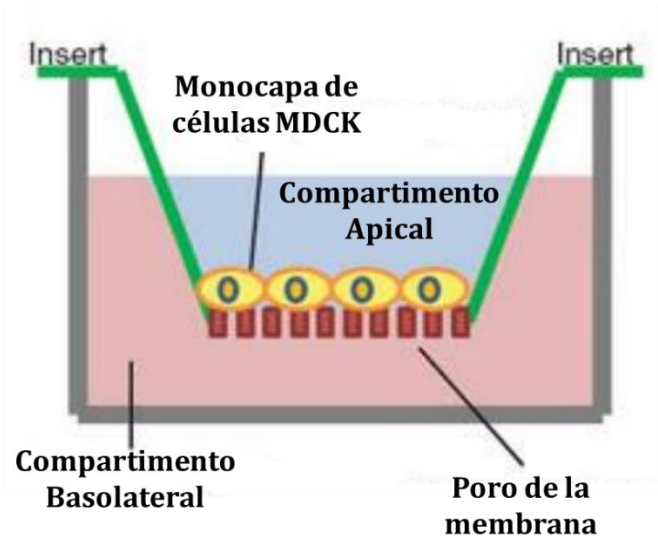


Figura 19. Cultivo celular en los pocillos.



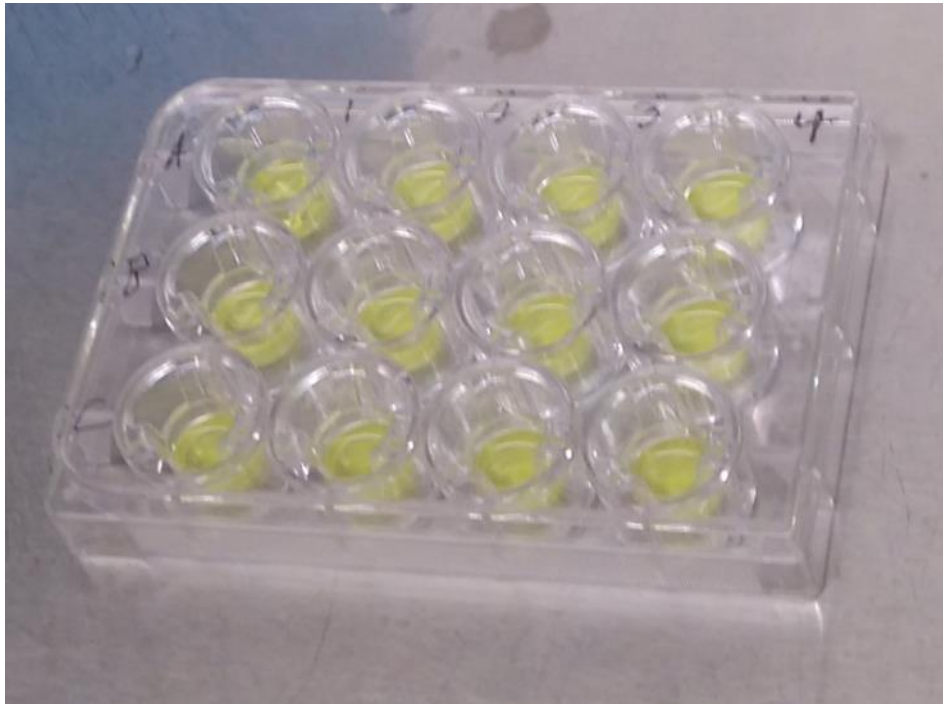


Figura 20. Ensayo de permeabilidad.

I.13.6. Cálculo de permeabilidad.

La permeabilidad de la monocapa se calculó con la siguiente ecuación.

$$P_c = \frac{V_R C_i}{A} \times \frac{dC_f}{dt}$$

P_c = Coeficiente de permeabilidad [cm/s]

V_R = Volumen receptor [mL]

A = Área de la membrana

C_i = Concentración apical inicial [μM]

C_f = Concentración final del receptor [μM]

t = Tiempo de ensayo [seg]

I.14 Creación de superficies antiincrustantes con capacidad de auto renovación

La adhesión no específica de proteínas endógenas y células a la superficie de los materiales dentro del entorno fisiológico, a menudo llamado "ensuciamiento o incrustaciones", puede tener muchas consecuencias negativas incluyendo trombosis, inflamación crónica, fibrosis, y la infección⁶⁸. Este tipo de incrustaciones puede comprometer el rendimiento y provocar el fallo de materiales implantables y dispositivos. Los ejemplos incluyen la interferencia en biosensores y la colonización bacteriana de lentes de contacto y catéteres permanentes^{69,70}. Es crítico para muchas aplicaciones de materiales biomédicos para lograr la capacidad persistente anti-incrustante mediante el control químico de la superficie o topografía⁶⁹⁻⁷⁵.

Un enfoque ampliamente perseguido para el diseño de superficies antiincrustantes es reducir la energía interfacial entre el material y su entorno mediante la creación de una capa hidrófila fina en la interfase de los mismos⁶⁸. Monocapas autoensambladas⁷⁶, compuestos zwitteriónicos bien empacados⁷⁷ y polianfolitos o polizwitteriones^{78,79}, polímeros peptidomiméticos⁸⁰, fosforilcolina que imita a la membrana celular^{81,82}, polímeros de etilen glicol y oligómeros^{76,83-85}, y muchas otras moléculas, se han utilizado como revestimientos sobre una variedad de sustratos de polímeros, les dotará con una excelente capacidad antiincrustante^{69,74,86-88}. Sin embargo, si bien el revestimiento o el sustrato de polímero se dañan debido a la abrasión mecánica, la capacidad de anti-incrustante se puede perder. Este es un problema significativo en una amplia gama de polímeros biomédicos y los implantes pueden estar sujetos a la abrasión mecánica durante el procesamiento y manipulación,

debido a esto se pueden comprometer las propiedades de superficie antiincrustantes lo cual provocaría una falla en su función y biocompatibilidad.

A continuación, presentaremos una estrategia simple basada en nanocompuestos para producir materiales poliméricos resistentes a la abrasión y con superficie antiincrustante. Como una demostración de principio, hemos preparado una matriz de poli (ϵ -caprolactona) (PCL), dopada con injertos de nanopartículas de ácido hialurónico PCL (HA). Estas nanopartículas, cuando están extendidas en la superficie, hacia forman una capa superficial "viscosa" altamente cargada, que resiste la contaminación biológica. Este revestimiento superficie se renueva después de la abrasión mecánica, ya que las nanopartículas están presentes en todo el grueso.

La Policaprolactona es un poliéster ampliamente conocido por ser biodegradable y biocompatible^{89,90}, con una amplia gama de aplicaciones médicas tales como suturas (Monocryl)⁹¹, en sistemas de administración de fármacos⁹² y soportes en la ingeniería de tejidos⁹³. El HA es un polisacárido de origen natural altamente hidrofílico y cargado negativamente^{94,95}. Se ha demostrado que las superficies con HA resisten la absorción de proteínas inespecíficas y la adhesión celular⁹⁶⁻⁹⁸, reducen la inflamación⁹⁹, y previenen la adhesión del tejido postquirúrgico^{100,101}. La aproximación introducida en este artículo proporciona un medio para retener las características a granel de la PCL, pero dotándola con la característica superficial de antiincrustamiento del HA, estas características se renuevan después de la abrasión.

El enfoque del concepto puede extenderse a muchos otros materiales que requieren una superficie anti-incrustante persistente y que brinde resistencia a la abrasión mecánica.

I.15 Materiales y métodos

HA sal de sodio (Na-HA, $M_w = 8.88 \times 10^6$ g/mol) fue comprada de Lifecore Biomedical. El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTA), la ϵ -caprolactona, el 1-butanol, el

octano estañoso, el dilaurato de dibutilestaño (DBTDL), el tolueno, el 1,6-diisocianato de hexametileno (HDI), el PCL ($M_n = 45000$) y el BSA marcado con fluoresceína fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich.

I.15.1 Síntesis del polímero

El CTA-HA se sintetizó utilizando un método adaptado de Pravata et al¹⁰². Brevemente, se disolvieron 0,55 g de bromuro de CTA en 7,5 ml de agua destilada a 40°C. Esta solución se añadió gota a gota a una solución acuosa de 0,6 g de Na-HA (1% en peso) a 40°C. El precipitado blanco formado se recogió y se lavó tres veces con agua caliente y después se secó al vacío.

Para sintetizar PCL (PCL-OH) con terminación -OH de cadena corta, se introdujeron en un matraz seco 10 g de monómero de ϵ -caprolactona y 0,11 g de 1-butanol, seguido de 20 ml de tolueno y 0,1 g de octano estañoso. Después de una mezcla completa, el matraz se colocó en un baño de aceite a una temperatura de 130 °C y la reacción se llevó a cabo durante 24 h bajo agitación magnética. El producto se enfrió y se vertió en 200 ml de éter dietílico, y el precipitado se recogió y se secó al vacío.

Para sintetizar PCL (PCL-NCO) con terminación isocianato de cadena corta, se introdujeron 5 g de PCL-OH y 0,4 g de HDI en un matraz seco, seguido de 25 ml de tolueno como disolvente y una gota de DBTDL en tolueno como catalizador. El matraz se colocó en un baño de aceite a 60 °C con agitación magnética. Después de 4 h, el producto se precipitó en 100 ml de éter dietílico. El precipitado se recogió y se secó al vacío.

Para sintetizar el copolímero con injerto HA-g-PCL, se añadieron 0,3 g de PCL-NCO y 0,3 g de CTA-HA en un matraz seco con 20 ml de DMSO como disolvente y con unas gotas de DBTDL en tolueno como catalizador. La reacción se llevó a cabo a

60 ° C durante 4 h. El producto se vertió en 80 ml de acetona. El precipitado se recogió y se lavó tres veces con acetona, después se secó al vacío.

El grupo CTA del copolímero de injerto fue removido de acuerdo con Pravata et al.¹⁰², en el que se disolvieron 0,3 g de CTA-HA-g-PCL en 30 ml de un amortiguador de fosfato 2: 1 (v / v) (0,3 M pH = 7,4) / DMSO y se dializó (MW = 3500 Da) frente a DMSO (1 día), etanol (1 día), agua (1 día), etanol (1 día) y finalmente agua (3 días). El producto se recuperó por liofilización.

I.15.2 Preparación de las películas de nano compuestos

Se disolvió PCL (Mn = 45000) en cloroformo. Una cantidad especificada de HA-g-PCL se dispersó en cloroformo y se sonicó durante 30 min utilizando un Dismembrador Sónico (modelo 100, Fisher Scientific). La suspensión resultante se vertió en una placa de Petri de vidrio, y el disolvente se evaporó para producir una película de polímero, que se moldeó a continuación por compresión a 100 ° C para formar una película lisa. El espesor de la película se midió usando un calibre.

I.15.3 Caracterización

¹H NMR spectra of polymers were recorded on a Varian Unity spectrometer (300 MHz) with CDCl₃ or DMSO-d₆ as solvent. FTIR was conducted using a Nicolet Series II Magna-IR System 750 with OMNIC® software for data collection and analysis.

I.16 Resultados

La Figura 21 muestra el espectro de ^1H -RMN del PCL sintetizado, mientras que la Figura 22 muestra el espectro de FTIR de la PLC funcionalizada con el grupo isocianato. La Figura 23 muestra el espectro del ácido hialurónico convertido a la sal CTA. Mientras que la figura 24 muestra al ácido hialurónico derivatizado con la PLC. Los resultados demuestran que fue posible derivatizar el ácido hialurónico con PLC para futuros estudios.

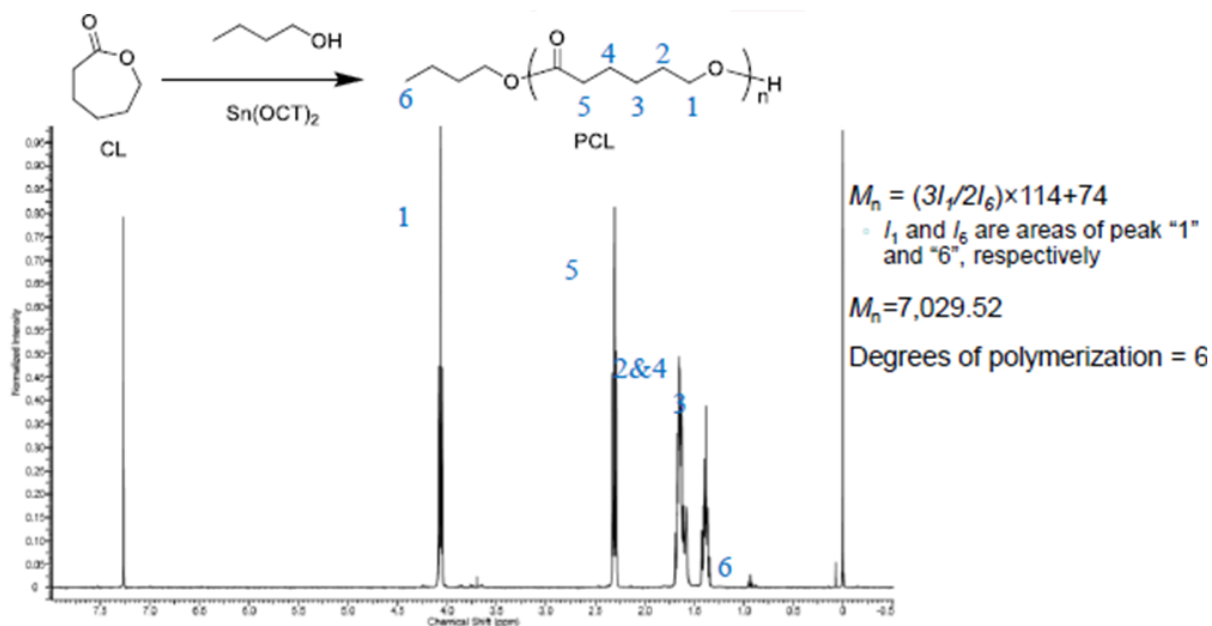


Figura 21. Espectro de ^1H -RMN de PLC sintetizada.

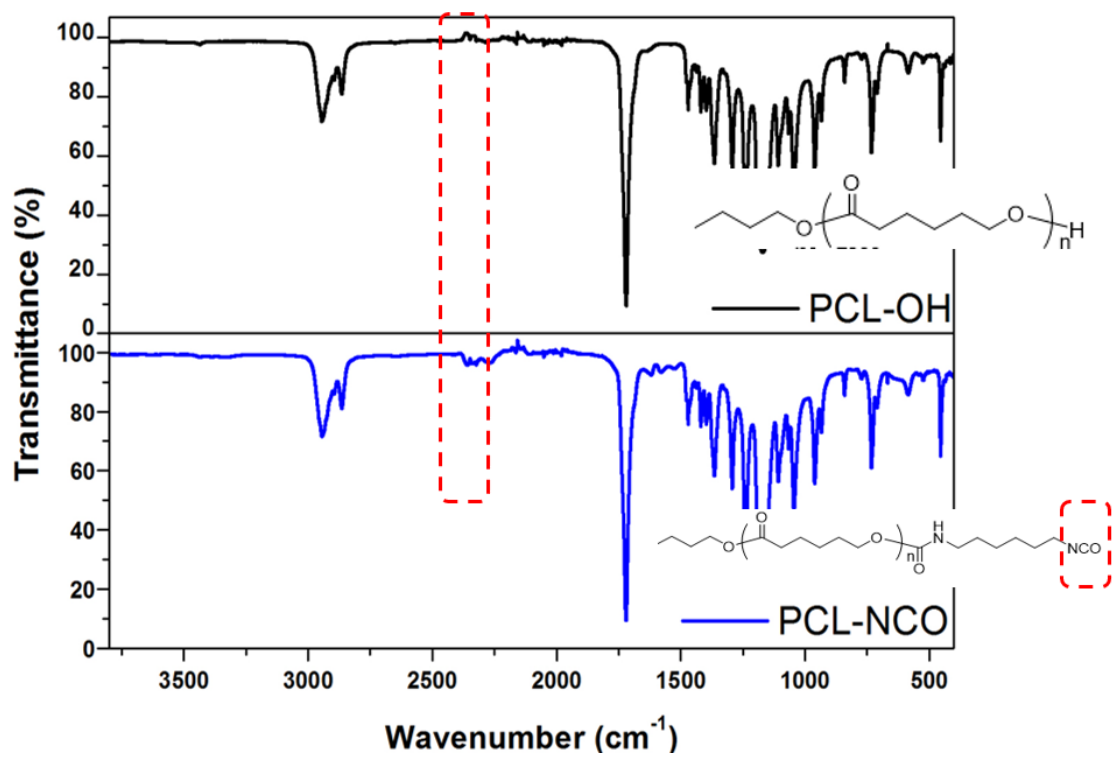


Figura 22. Figura de FTIR del PLC y de PLC-NCO indicando el grupo isocianato.

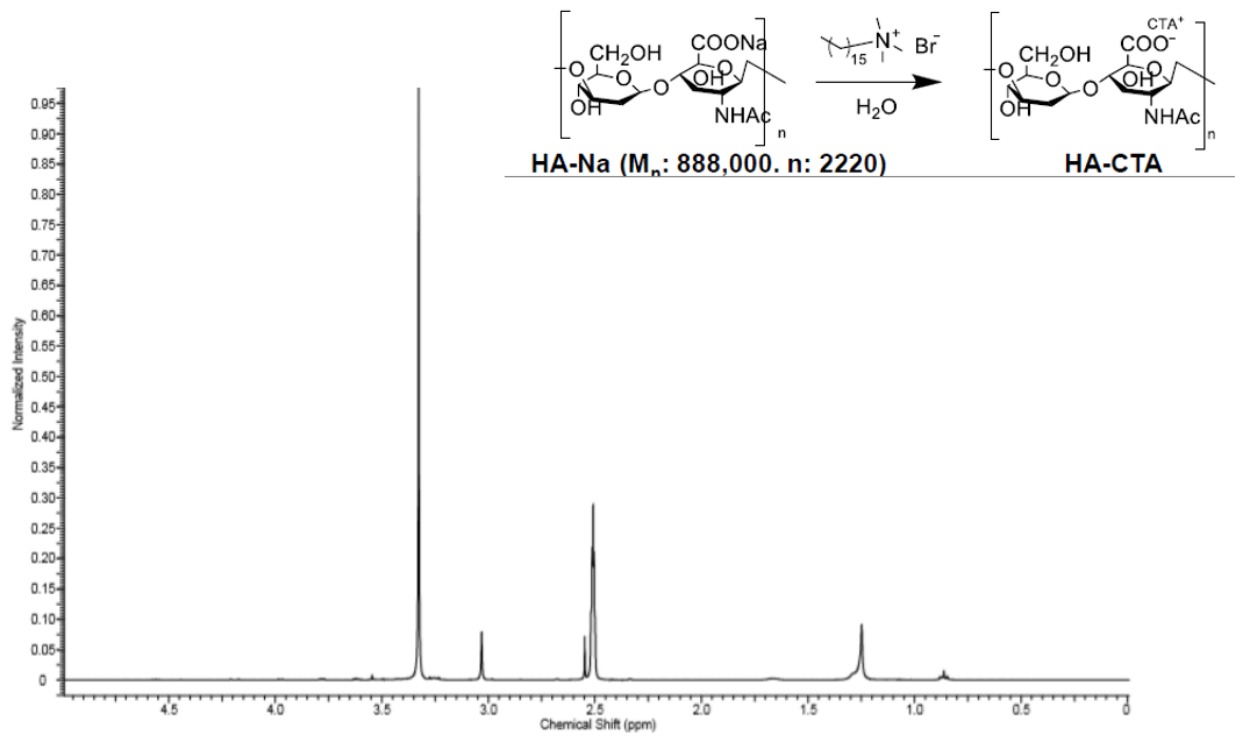


Figura 23. Espectro de ¹H-RMN del HA en forma de sal con CTA.

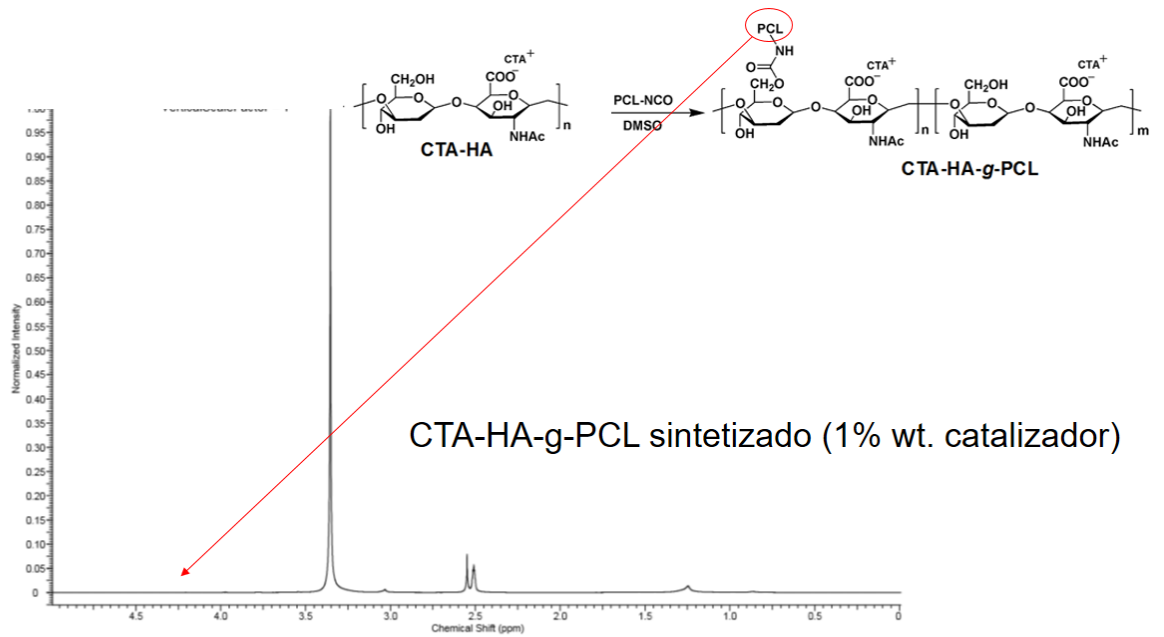


Figura 24. Espectro de ¹H-RMN del HA-g-PC

