PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Evaluación de la Efectividad de Nanogeles Sensibles a la Temperatura y al pH como Sistema de Liberación de Fármacos Antiinflamatorios.

TESIS DOCTORAL

Por

ALONDRA MONTAÑEZ RIOS

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Aracely Serrano Medina

Codirector

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana B.C. 2023

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.349
Tijuana, B.C., a 13 de junio, 2023

C. Alondra Montañez Rios
Pasante de: Doctorado en Ciencias
Presente

POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER

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

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

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Evaluación de la Efectividad de Nanogeles Sensibles a la Temperatura y al pH como Sistema de Liberación de fármacos antiinflamatorios.

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

I. INTRODUCCIÓN
II. TEORIA GENERAL
III. METODOLOGIA
IV. RESULTADOS Y DISCUCION
V. CONCLUSIONES
VI. REFERENCIAS

M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora

Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INDICE

Índice	**I**
Índice de figuras	**II**
Tablas	**III**
Graficas	**IV**
Agradecimiento	**V**

INDICE

RESUMEN		**1**
Capítulo I	**INTRODUCCIÓN**	**2**
I.I	**Antecedentes**	**3**
I.II	**Justificación**	**7**
I.III	**Hipótesis**	**8**
I.IV	**Objetivo general**	**8**
I.V	**Objetivos específicos**	**8**
Capitulo II	**TEORÍA GENERAL**	**Pagina**
II.I	**ARTRITIS REUMATOIDE**	**11**
II.I. I	**PROCESOS INFLAMATORIOS**	**13**
II.I. II	Fases de la inflamación	**15**
II.II	**ANTIINFLAMATORIOS**	**16**
II.III	**NANOMEDICINA Y NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**	**19**
II.IV	**NANOTECNOLOGÍA EN EL SUMINISTRO DE FÁRMACOS**	**20**
II.IV.I	Nanogeles termo-responsivos	**21**
II.V	**POLÍMERIZACIÓN**	**22**

II.VI	**TIPOS DE POLIMERIZACIÓN**	**24**
II.VI.1	Polimerización heterogénea por radicales libres	**24**
II.VI.2	Polimerización en suspensión	**24**
II.VI.3	Polimerización en dispersión	**25**
II.VI.4	Polimerización en emulsión	**20**
II.VI.5	Polimerización en emulsión sin detergente	**26**
II.VI.6	Polimerización núcleo-coraza	**28**
II.VI. I	Polímeros sensibles a estímulos	**29**
II.VI.II	Polímeros inteligentes	**30**
II.VII	**ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS**	**31**
II.VII.I	Cargado de nanogeles con fármacos y biomoléculas	**31**
II.VIII	**SISTEMAS DE LIBERACIÓN**	**32**
II.VIII.I	Principios de la liberación controlada de fármacos en nanogeles.	**33**
II.IX.	**TOXICIDAD DE NANOMATERIALES.**	**35**
II.IX. I	Mecanismos de toxicidad	**36**
II.X	**BIOMATERIALES FLUORESCENTES**	**37**
II.X. I	Administración de medicamentos por imágenes	**37**
II.X. II	Nanopartículas teranósticas	**37**
II.X. III	Biomateriales fluorescentes	**38**
II.X. IV	Luminiscencia	**39**
II.X. IV	Fluorescencia y fosforescencia	**40**

Capitulo III	METODOLOGÍA	Pagina

III	**MATERIALES**	**43**
III.I.	**SÍNTESIS DEL MONÓMERO FLUORESCENTE (METACRILATO DE FLUORESCEÍNA**	43
III.II.	**CARACTERIZACIÓN DE MONÓMERO FLUORESCENTE**	44
	Espectrofotometría de infrarrojo	44
	Resonancia magnética nuclear	44
III.III.	**SÍNTESIS DE NANOGELES FLUORESCENTES**	45
III.IV	**TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA LOS NANOGELES SINTETIZADOS**	46
	Dispersión de Luz Dinámica (DLS).	46
	Potencial Z.	46
	Estudio del efecto del pH y la temperatura en el tamaño de las nanogeles	46
III.V.	***LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES***	47
III.VI.	**CARGADO DE LAS NANOGELES CON INDOMETACINA**	47
	Método de equilibrio	47
	Determinación de la capacidad de carga de los nanogeles	48
	Estudios de liberación	49

Curva de calibración de IND por UV-VIS 49

III.VII ***ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO*** 49

Cultivos celulares 49

Ensayo de citotoxicidad in vitro 49

Ensayo de viabilidad celular 50

III.VIII **ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN VIVO DE LA INDOMETACIONA EN MODELOS DE RATA** 50

Inducción del edema con carragenina. 50

Análisis del efecto antinflamatorio de los nanogeles de indometacina en ratas wistar. 51

Efecto de la formalina como agente nociceptivo. 51

Determinar la concentración mínima de nanogeles con efecto antiinflamatorio. 52

Capitulo IV	Resultados y discusión	Pagina

IV.I.	**SÍNTESIS DE METACRILATO DE FLUORESCEÍNA**	**54**
IV.II.	**CARACTERIZACIÓN**	**54**
IV.III.	**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS**	**57**
IV.III. I	Síntesis de nanogeles al de DEAEM/MCF 15:0.5 EGDMA/APS	**57**
IV.III.II	Síntesis de nanogeles al de DEAEM/MCF 15:0.3 APS/EGDMA	**60**
IV.III.III.	Síntesis de nanogeles al de DEAEM/MCF 15:0.3 DVA/APS	**63**
IV.IV.	Potencial Zeta	**66**
IV.V	Síntesis de NIPAAm/DEAMEM 5%, DVA/APS	**67**
IV.VI	Síntesis de nanogeles al de DEAEM 5% EGDMA/APS	**70**
IV.VII	Síntesis de nanogeles al de DEAEM 10% DVA/APS	**73**
IV.VIII	Síntesis de nanogeles al de DEAEM 10% EGDMA/APS	**76**
IV.IX	**CARGADO DE NANOPARTICULAS**	**79**
IV.X	**CARGADO DE NANOGELES CON INDOMETACINA**	**80**
IV.X.I	Curva de calibración de la indometacina	**81**
IV.X.II	Estudios de liberación controlada de fármacos	**81**
IV.X.III	Estudios de liberación de nanogeles cargados con indometacina	**82**
IV.XI	**ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR**	**85**
IV.XII		**88**

IV.XII.I	Efecto de la formalina como agente nociceptivo	**88**
IV.XII. II.	Efecto de la carragenina como agente inflamatorio	**91**
Capítulo V	**CONCLUCIONES**	**94**
Capítulo VI	**REFERENCIAS**	**63**

Imagen	**Índice**	**Pagina**
I	Estudio de campo en México de enfermedades reumáticas	**12**
II	Proceso inflamatorio	**13**
III	Escala analgésica de la OMS	**17**
IV	Ejemplo de un monómero siendo polimerizado para convertirse en un polímero	**30**
V	Administración de fármacos dirigida específicamente.	**31**
IV	Liberación de fármacos a partir de nanogeles	**34**
V	Representación del espectro de luz a diferentes longitudes de onda	**39**
VI	Diagrama de Jablonski	**40**
VII	Estructura de Metacrilato de fluoresceína.	**54**
VIII	Espectros Infrarrojo	**56**
IX	Resonancia magnética nuclear (RMN)	**57**

Figura	Índice	Pagina
I	Nanogel con coraza de PEG Copolimerizado con grupos amino sensibles al pH	22
II	Esquema de la primera fase de la polimerización en emulsión.	26
III	Esquema de la polimerización en emulsión sin detergente	28
IV	Factores que influyen en la toxicidad de las nanopartículas	35
V	Síntesis de biomateriales	45

Tablas	Índice	Pagina
I	Concentraciones y entrecruzantes utilizados en las síntesis de nanogeles	46
II	Potencial Zeta	62
III	% de cargado y en nanogeles cargados con Indometacina	80

GRAFICAS	Índice	Pagina
I	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/ EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ MCF $_{0.5\%mol}$	58
II	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.5\%mol}$ en un barrido de temperaturas.	59
III	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.5\%mol}$.	60
IV	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$	61
V	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$ en un barrido de temperaturas.	62
VI	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ MCF $_{0.3\%mol}$	63
VII	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC 0.$_{3\%mol}$	64
VIII	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$ en un barrido de temperaturas.	65
IX	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$	66
X	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM5$_{\%mol}$	68
XI	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM$_{5\%mol}$ en un barrido de temperaturas	69
XII	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{5\%}$	70

XIII	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA /DEAEM$_{5\%mol}$	**71**
XIV	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{5\%mol}$ en un barrido de temperaturas	**72**
XV	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{5\%}$	**73**
XVI	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM$_{10\%mol}$	**74**
XVII	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM$_{10\%mol}$ en un barrido de temperaturas.	**75**
XVIII	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{10\%}$.	**76**
XIX	Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{10\%mol}$	**77**
XX	Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{10\%mol}$ en un barrido de temperaturas	**78**
XXI	Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{10\%}$	**79**
XXII	Curva de calibración de indometacina.	**81**
XXIII	Liberación del Indometacina a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA$_{5\%mol}$ a 37°C y pH 7.4 y 6.4	**83**
XXIV	Liberación de indometacina a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA$_{10\%mol}$ y NIPAAm/PEGMAM/ DVA$_{10}$DVA$_{5\%mol}$/MCF$_{0.1\%mol}$, a 37°C y pH 7.4	**84**
XXV	Liberación del Indometacina a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/ EGDMA$_{5\%mol}$, a 37°C y pH 7.4 y 6.4	**85**
XXVI	Pruebas de viabilidad celular en células 3t3 de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA y nanogeles cargados con indometacina	**86**

XXVII	Pruebas de viabilidad celular en células 3t3 de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM a dos concentraciones de $EGDMA_{10\%mol/5\%mol}$ y a NIPAAm/PEGMAM/ $EGDMA_{15\%mol}/MCF_{0.5\%mol}$	**87**
XXVIII	Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de formalina, utilizando nanopartículas de EGDMA Y DVA cargadas con indometacina.	**89**
XXX	Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de formalina, Fase I	**90**
XXXI	Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de formalina, Fase II.	**90**
XXXII	Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de Carragenina, de nanogeles de DVA/IndO.	**92**
XXXIII	Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de Carragenina, de nanogeles de EGDMA/IndO.	**93**

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

I.I. ANTECEDENTES

La nanomedicina aplicada en las ciencias de la salud es la rama de la nanotecnología que se perfila como la de mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas.

La nanomedicina estudia interacciones a la nano-escala y para ello utiliza dispositivos, sistemas y tecnologías que incluyen nanoestructuras capaces de interactuar a escala molecular y que se interconectan a nivel micro para interaccionar en el nivel celular.[1,2]

La nanomedicina agrupa tres áreas principales: el nano-diagnóstico, la liberación controlada de fármacos (nano-terapia) y la medicina regenerativa.

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 reacciones adversas y toxicidad asociada a los mismos.[2] Para evitar estos efectos no deseados 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. [3]

La liberación de fármacos cargados en microgeles/nanogeles puede realizarse por difusión, degradación de microgel/nanogel o desplazamiento por iones presentes en el medio ambiente.[4,5]

El uso de microgel y nanogel como dispositivos de administración de medicamentos brinda algunas oportunidades en comparación con otros sistemas:

- El tamaño de partícula influye en la capacidad de penetración de los tejidos por vías para-celulares o transcelulares; Los nanogeles pueden llegar incluso a los vasos capilares más pequeños.
- La liberación controlada en el área objetivo-desencadenada por estímulos ambientales localizados, en lugar de la administración sistémica del agente activo, puede mejorar la eficiencia terapéutica y reducir los efectos adversos fuera del objetivo.

Anteriormente se han sintetizado nanogeles de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) y el monómero básico metacrilato de *N,N*-dietilaminoetilo por una reacción de polimerización por emulsión sin detergente, usando como entrecruzante metacrilato de poli(etilenglicol) metil éter (PEGMAM). Rios A. et al. *(2019),* sintetizaron nanogeles de NIPAAm con indicadores catiónicos y aniónicos, donde obtuvieron tamaños de partículas de 50 nm a 200 nm, con una distribución de partícula uniforme y un índice de polidisperción (PDI) no mayor 0.2. Realizaron estudios de toxicidad utilizaron como modelo *in vivo C. elegans* donde evaluaron la toxicidad de los nanogeles sintetizados midiendo el tamaño, volumen, esperanza de vida, fertilidad de los nematos y, marcando con un monómero fluorescente, validaron que los nanogeles eran consumidos y distribuidos por todo el aparato digestivo de *C. elegan*[6]. Este artículo nos aporta información importante para comprender el

comportamiento de las nanopartículas que se pretenden sintetizar con características similares y comprender su comportamiento y toxicidad.

Por otra parte, *Jie Shen y colaboradores*, desarrollaron un método de polimerización en emulsión sin tensoactivo a una bajo una baja concentración del iniciador azo-bis-(diclorhidrato de 2-metilpropionamidina) (AIBA), encontrando que la conversión del monómero fue limitada. Al aumentar la concentración de iniciador concentración la conversión del monómero aumento por encima del 99%, y el tamaño de partícula disminuyó.

Las partículas de látex con un tamaño uniforman se obtuvieron al fijar la relación molar en 1:2, mientras que las de diferente tamaño se observan en una relación molar inferior o superior. La protonación de los grupos aminos en las moléculas de DMAEM es crucial en la polimerización. La polimerización se realizó bien con alta conversión del monómero y distribución del tamaño de partícula en una proporción 1% AIBA; 5% DEAEM; 1:2 HCl/DEAEM. [7]

Los sistemas termosensibles han mostrado gran versatilidad debido al preciso control sobre la respuesta del sistema a los cambios térmicos. Por ejemplo, Serrano-Medina A. *et al.* (2009), sintetizaron e investigaron las propiedades de nano/micro geles de copolímeros núcleo-coraza sensibles a pH y temperatura, utilizando NIPAAm para el núcleo reticulado y PEGMAM para estabilizar la cubierta. Se obtuvieron como resultado partículas mono-dispersas. con diámetros hidrodinámicos promedio que varían de 40 a 880 nm, determinados por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) en agua a 25 °C, dependiendo de las proporciones utilizadas de los monómeros al realizar la síntesis. Se estudió la influencia de

PEGMAM y se estudió el contenido de ácido metacriloiloxi-o-benzoico (2MBA) en la transición de tamaño y temperatura a diferentes valores de pH. Se observó que la concentración de PEGMAM tiene una gran influencia en el tamaño y la densidad de los micro y nanogeles sintetizados.[8]

En otros estudios Bernardi A. *et al*., compararon los efectos del tratamiento de nanocápsulas cargadas con indometacina (IndOH-NC) e indometacina libre (IndOH) en modelos de rata con edema agudo y crónico. Se adaptaron distintos esquemas de tratamiento. En el esquema profiláctico, los animales fueron pretratados con grupos de IndOH-NC e IndOH en solución (solución de carbonato de calcio al 3%) antes de la inyección de carragenina (1mg/kg, i.p.). En el esquema terapéutico los animales recibieron IndOH-NC o IndOH (1mg/kg, i.p.), después de la inyección de carragenina. Los grupos control recibieron nanocápsulas descargadas y la solución del vehículo (carbonato de calcio al 3%) (1mg/kg, i.p.). Examinaron los efectos de los tratamientos y los resultados demostraron que la administración profiláctica de IndOH o IndOH-NC (1 mg·kg-1, ip, antes de la carragenina) inhibió marcadamente el edema inducido por la carragenina, cuando se comparó con los respectivos grupos control, con una inhibición del 61,4%. y 63 3% respectivamente. Además, el edema provocado por la inyección de carragenina en la pata de la rata se redujo significativamente con la administración terapéutica de IndOH o IndOH-NC (1 mg·kg-1, ip) administrada después de la carragenina, con una inhibición del 31,11 % y del 44,7 % respectivamente. La comparación de la inhibición observada para IndOH e IndOH-NC no reveló ninguna diferencia significativa en el efecto de las formulaciones probadas.[9] Este artículo nos aporta

información importante para nuestro estudio ya que nos permite comprender el comportamiento de los fármacos antiinflamatorios como la indometacina, la cual es relevante para este estudio ya que se pretende realizar cargados de nanogeles con el mismo fármaco y verificar su eficacia comparada con un grupo control.

Una característica indispensable en las nanopartículas con aplicación farmacéutica es que sean biocompatibles, esto se puede lograr si las nanopartículas contienen cadenas de polietilenglicol (PEG) en su superficie.[10] Manzanares-Guevara *et al.,* prepararon nanogeles catiónicos PEGilados a base de poli(N,N-dietilaminoetilmetacrilato) (PDEAEM) variando las proporciones de PDEAEM a polietilenglicol (PEG), dando como resultado nanogeles de diferentes cargas superficiales. Obtuvieron nanogeles con contenido variable de DEAEM (15-45 wt. %), con tamaños entre 120 y 150 nm (diámetro hidrodinámico, Dh), todos con carga superficial positiva (Potencial Zeta positivo). Probaron la citotoxicidad de los nanogeles en línea celular de fibroblastos de ratón (L-929). La viabilidad celular la evaluaron mediante ensayos de proliferación celular MTS. De los nanogeles estudiados, N1 y N2 resultaron ser citotóxicos para L-929, ya que la viabilidad celular se redujo a valores en torno al 12%. Mientras que los nanogeles que contenían 100% y 45% de PDEAEM (N1 y N2) redujeron la viabilidad celular, los nanogeles que contenían 20 % y 15 % de PDEAEM (N3 y N4) no redujeron la viabilidad celular en absoluto.[11]

I.2 JUSTIFICACIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica autoinmune de larga duración, El Congreso del Colegio Mexicano de Reumatología, reportó una prevalencia del 1.6% dentro de la población, lo que colocó a México dentro de los países con alto porcentaje en AR. Actualmente, la terapia clínica para la AR incluye principalmente medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE se usan para aliviar el dolor y la inflamación de la AR. El uso crónico y en dosis altas de AINE puede provocar efectos secundarios graves. La necesidad de una terapia segura, eficaz y con menos efectos secundarios contra enfermedades musculo-esqueléticas al ser enfermedades con tratamientos prolongados y en la mayoría de los casos con estrecho margen terapéutico, nos impulsa a la búsqueda de terapias en las cuales se aproveche al máximo la utilidad de fármacos antineoplásico y fármacos antinflamatorios (no-esteroidales y corticosteroides), que puedan garantizar mayor seguridad con menos efectos colaterales, llegando a los sitios de daño y con menores afectaciones a el tejido sano.

Existen investigaciones sobre la síntesis de nanomateriales a base de polímeros sensibles a la temperatura, pH y otros estímulos ambientales; estos con el fin de aplicarlos como sistemas de liberación de fármacos que sean útiles para el desarrollo de vehículos farmacéuticos. La síntesis de nanogeles puede ser una alternativa para ser utilizados como vehículos acarreadores de fármacos ya que por sus capacidades para penetrar tejidos tumorales y/o inflamados por el fenómeno de EPR (el fenómeno de permeación y retención incrementada), con la adecuada

selección de polímeros y una formulación óptima, pueden llegar a el tejido dañado minimizando la distribución sistémica y por lo tanto disminuyendo los efectos adversos.

I.3 HIPÓTESIS

Las nanopartículas de poliméricas de NIPAAm y DEAEM pegiladas, pueden ser cargadas con el fármaco antiinflamatorios indometacina, y liberar el fármaco de manera específica en tejido inflamado, reduciendo los efectos adversos del medicamento.

I.4 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanogeles de 2-(dietilamino)etil metacrilato (DEAEM) y NIPAAm mediante polimerización en emulsión sin detergente, sensibles a la temperatura y al pH, para la liberación sitio específica de indometacina en articulaciones de rata.

I.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar metacrilato de fluoresceína (nombre del nombre del método de síntesis).
2. Caracterizar el metacrilato de fluoresceína mediante de FTIR y RMN.

3. Sintetizar nanogeles de 2-(dietilamino)etil metacrilato (DEAEM) y NIPAAm, entrecruzados con DVA y/o EDGMA mediante polimerización en emulsión sin detergente. Sintetizar un lote marcado con fluoresceína.
4. Caracterizar los nanogeles sintetizados en su diámetro hidrodinámico mediante dispersión de luz dinámica (DLS), microscopia de escaneo de transmisión electrónica (STEM) y potencial Zeta.
5. Evaluar la respuesta de los nanogeles sintetizados al pH y a la temperatura a través de (DLS),
6. Evaluar la estabilidad de los nanogeles al proceso de liofilización y reconstitución.
7. Realizar el cargado de indometacina a los nanogeles sintetizados para cuantificar su eficiencia de carga por el método de equilibrio.
8. Determinar la cinética de liberación mediante ensayos *in vitro,* para determinar el tiempo de liberación del fármaco.
9. Evaluar la citotoxicidad de los nanogeles sintetizados, por medio de ensayos de viabilidad celular.
10. Estudiar el efecto antiinflamatorio de los nanogeles cargados con indometacina en ratas Wistar con el modelo de la inflamación y el dolor; así como determinar la concentración mínima efectiva de los nanogeles en respuesta a la inflamación.

CAPITULO II

TEORÍA GENERAL

I. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR), se caracteriza por una inflamación sistémica y autoinmune, con inflamación sinovial, producción de autoanticuerpos y estrechamiento del espacio articular.[12] Muchas citocinas proinflamatorias y mediadores liberados por estas células inflamatorias también provocan una destrucción tisular grave y daños inflamatorios secundarios en la AR, y la consiguiente destrucción de cartílago y hueso. La enfermedad tiene una prevalencia del 1%.[13,14]

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica de larga duración. La artritis reumatoide causa inflamación afectando principalmente las articulaciones, lo que origina; dolor, hinchazón, rigidez, pérdida de funciones.[15]

Aunque la etiología de la AR aún no se comprende de todo, basado en los principios fundamentales de la inmunología y la asociación con el complejo principal de histocompatibilidad de clase II, múltiples estudios han demostrado que las T CD4+ son de gran importancia para impulsar la actividad de la enfermedad, las células B y los macrófagos que invaden la membrana sinovial articular son la causa del daño articular y del cartílago[16]. Muchas citocinas proinflamatorias y mediadores liberados por estas células inflamatorias también provocan una destrucción tisular grave y daños inflamatorios secundarios en la AR.[17]

Las células que infiltran la membrana sinovial reumatoide son ~30% de células T. Las células T reumatoides se encuentran activadas y son capaces de inducir interleucina 1 (IL-1), TNF-α y metaloproteínas. Estas células pueden persistir en las articulaciones debido a una apoptosis defectuosa.[18] Además, la estimulación de las

células inflamatorias para liberar especies reactivas de oxígeno (ROS) en el líquido sinovial tiene lugar ante la sobreproducción de citoquinas, cuya relevancia se enfatiza en la medida en que sirve como intermediario del daño tisular.[19]

En 5 regiones de México con una muestra de 19,213 individuos, se encontró que alrededor del 14% de la población de estudio padecía de alguna enfermedad reumática. Dentro de éstas, la AR tuvo una prevalencia de 1.6% dentro de la población de estudio. El Congreso del Colegio Mexicano de Reumatología, reportó una prevalencia del 1.6% dentro de la población lo que colocó a México dentro de los países con alto porcentaje en Artritis Reumatoide.[20]

La Secretaría de Salud no lleva a cabo ningún programa o iniciativa para el control de las enfermedades reumáticas. Su acción se limita a garantizar el acceso a su tratamiento. Las Enfermedades Reumatoides afectan a aproximadamente 10 millones de personas en México, siendo la Artritis Reumatoide y la Osteoartritis las dos más comunes, afectan a 1 y 8 millones de personas respectivamente.[20] (5)

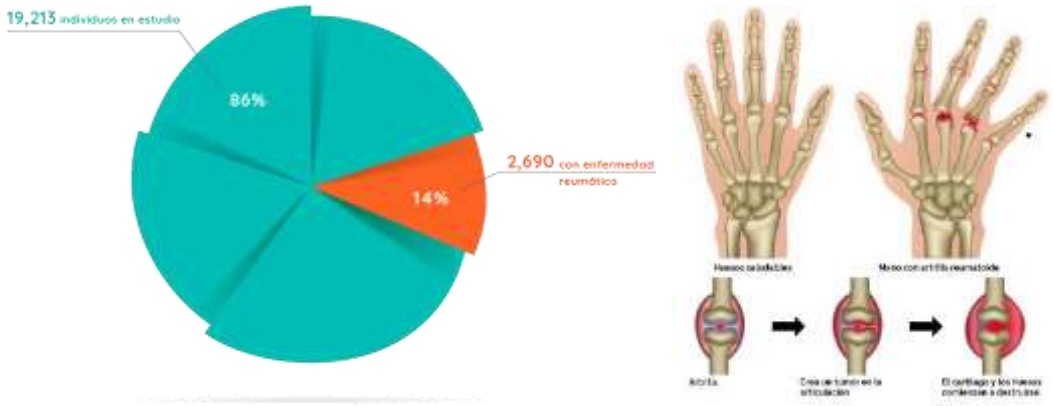


Imagen I. Estudio de campo en México de enfermedades reumáticas.

II.I.I Procesos Inflamatorios

La inflamación es un proceso complejo e inespecífico, que se caracteriza por modificaciones locales y coordinadas de los vasos sanguíneos y el tejido conectivo; que consiste en la regeneración de las células parenquimatosas dañadas. Se caracteriza clínicamente por calor, rubor, tumor, dolor y pérdida de función.[21]

La inflamación es una respuesta provocada por el cuerpo cuya principal tarea es la de restauración de tejido y juega un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades como asma, **artritis reumatoide**, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis y cáncer.[22]

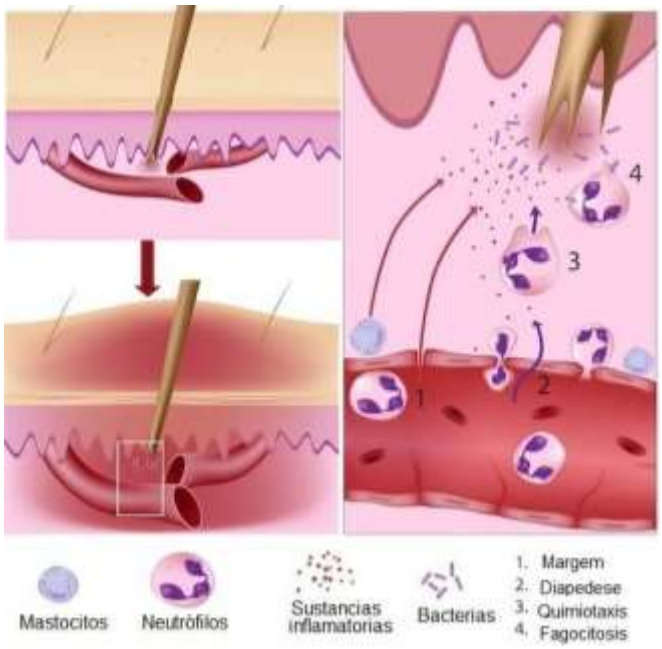


Imagen II. Proceso inflamatorio.

La inflamación es un proceso propio del tejido conectivo vascularizado y en ella participan el plasma y las células circulantes y residentes del tejido conectivo. Los elementos principales que participan en este proceso son:[23]

- Los mediadores de la inflamación.
- Vasos sanguíneos.
- Y varios tipos de células:
- ✓ Granulocitos, monocito-macrófagos, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos, estos últimos con un importante rol en la inflamación crónica

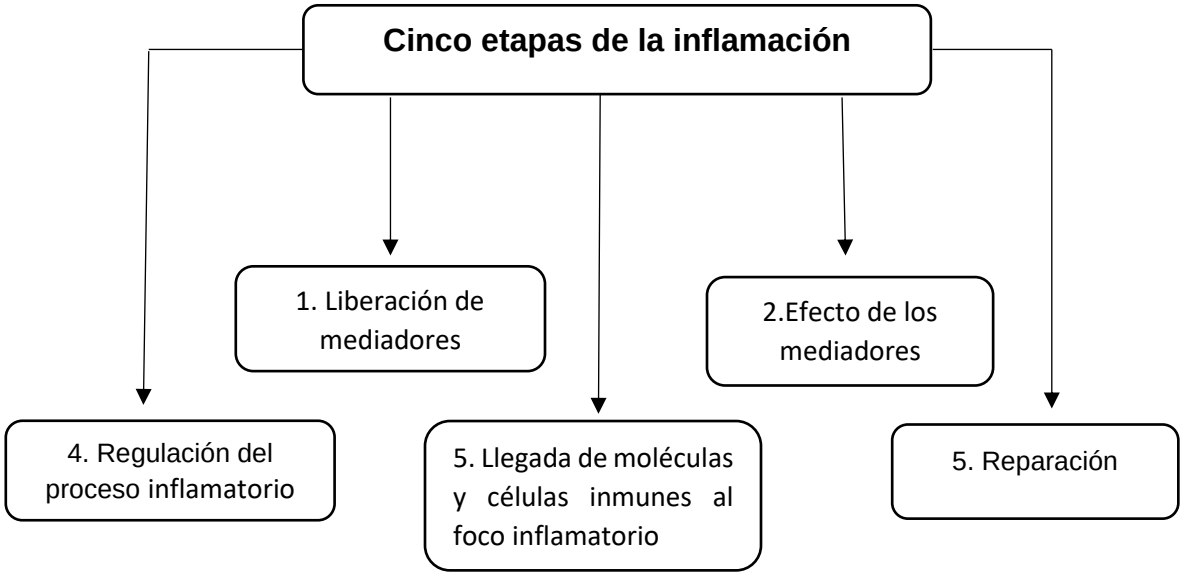
Los mediadores de la inflamación pueden ser de origen plasmático o celular. Entre los mediadores de origen plasmático están:[24,25]

- El sistema de complemento.
- El sistema de coagulación, que termina con la producción de trombina.
- El sistema fibrinolítico, que produce fibrinopéptidos.
- El sistema de quininas, que genera bradiquinina, el plasma.
- Células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos).
- Los vasos sanguíneos.
- Los constituyentes celulares (mastocitos, fibroblastos y macrófagos)
- Y extracelulares (colágeno, elastina, glicoproteínas de adhesión como la fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, tenascina, y proteoglicanos) del tejido conjuntivo.

El tumor se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. [26]

La respuesta inflamatoria (RI) está estrechamente relacionada con el proceso de reparación. La RI es útil para destruir, atenuar o mantener localizado al agente lesivo, y simultáneamente inicia una serie de acontecimientos que pueden determinar la cura o reconstrucción del tejido lesionado.[27]

I.I.II. FASES DE LA INFLAMACIÓN



"La inflamación no es una enfermedad, sino una respuesta inespecífica que produce un efecto saludable en el organismo en que tiene lugar". [28]

Las proteínas de fase aguda, como la PCR y las citocinas, se elevan notablemente en relación con la infección y la inflamación. Durante este proceso, se produce acidosis local debido a la infiltración masiva de neutrófilos y macrófagos.[29]

La cascada inflamatoria generalmente se estimula en respuesta a agresiones extracelulares como una invasión microbiana, corte, herida, exposición a

contaminantes o agresiones intracelulares como células dañadas.[28] Las respuestas inflamatorias se montan debido a la interacción entre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, donde la inmunidad innata proporciona la primera línea de defensa y desencadena una respuesta inmunitaria adaptativa, mientras que las respuestas inmunitarias adaptativas dependen de las respuestas inmunitarias innatas para los leucocitos y los mediadores inflamatorios.[30] La inflamación siempre va acompañada de cambios en la vascularidad del tejido y alteración de la permeabilidad.[31]

- Los mastocitos liberan factores quimiotácticos como factor activador de plaquetas, leucotrienos B4, histaminas y factores quimiotácticos de neutrófilos para dirigir el movimiento de leucocitos y proteínas séricas desde el torrente sanguíneo hasta el sitio extravascular del tejido dañado.

  Los leucocitos se adhieren a la superficie endotelial, se arrastran y migran fuera de la vascularidad.

La inflamación siempre va acompañada de cambios en la vasculatura del tejido y alteración de la permeabilidad. [32]

II.II ANTIINFLAMATORIOS

Existe una gran cantidad de evidencia sobre el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) con respecto a la eficacia analgésica y el perfil de seguridad. [(9)]

Más de 30 medicamentos antiinflamatorios no esteroideos disponibles en la actualidad comprenden la clase de medicamentos más utilizada. Los AINEs representan uno de los grupos farmacológicos más consumidos en el mundo. que comparten acciones terapéuticas para el control en diverso grado del dolor, la inflamación y la fiebre. (10)

El uso generalizado de los AINE es un reflejo de su eficacia antiinflamatoria y analgésica bien establecida en una variedad de condiciones de dolor agudo y crónico. 33

En la imagen X se representan los fármacos utilizados en el primer Peldaño de la Escalera Analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el que cada uno de los tres escalones representa el proceso de selección de un fármaco específico para un tipo de dolor determinado en función de la intensidad de este.34

Imagen III. Escala analgésica de la OMS.

Muchas guías recomendaban los AINE como terapias de primera línea para diversas afecciones, como la artritis gotosa aguda, la osteoartritis (OA)8 y la migraña.[35]

La principal preocupación que limita su uso es el desarrollo de complicaciones gastrointestinales graves como úlceras sangrantes.[36] El bien documentado el beneficio clínico de los AINE puede verse afectado por el riesgo de enfermedades gastrointestinales (GI), cardiovasculares (CV), efectos secundarios renales y hepáticos, que están asociados con altas dosis de estos agentes o su uso prolongado.[37] Debido a preocupaciones de seguridad, la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. emitió una recomendación de que los AINE deben usarse en "la dosis efectiva más baja durante el menor tiempo posible de acuerdo con los objetivos de tratamiento de pacientes individuales". [38]

La actividad antiinflamatoria de los AINE se logra a través de la inhibición reversible (o en el caso de la aspirina, irreversible) de las enzimas ciclooxigenasa (COX) COX-1 y COX-2, reduciendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos mediadores de la inflamación.[39]

Dado que los efectos analgésicos y antiinflamatorios de los AINE están mediados por la inhibición de la COX-2 y sus efectos secundarios gastrointestinales principalmente por la inhibición de la COX-1, los AINE que inhiben selectivamente la COX-2 podrían reducir el riesgo de toxicidad gastrointestinal en comparación con otros AINE.[40]

II.III. NANOMEDICINA Y NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

La nanotecnología se define como el «desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm, para obtener una comprensión fundamental de fenómenos y materiales en dicha escala nanométrica y para crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades y funciones debido a su tamaño.[7]

La ciencia de los nanobiosistemas es una de las aéreas más desafiantes y es un componente de la nanotecnología de más rápido crecimiento, es esencial para comprender los sistemas biológicos y para desarrollar nuevas herramientas para la medicina, tales como la síntesis de nuevos principios activos y su liberación sitio específica, medicina regenerativa, etc.[41]

La nano biomedicina es un área que aplica los principios y técnicas de la nano escala para entender y transformar materiales inertes y biosistemas para propósitos médicos, tales como, la síntesis de un principio activo, diseño de dispositivos para liberación controlada de fármacos, entender los procesos neurológicos, remplazar un órgano, etc. La integración de la nanotecnología con la biomedicina, la biología, con información tecnológica y la ciencia cognitiva, se espera que se acelere a un más.[42]

El nano-diagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para detectar una enfermedad o un mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles tanto *in vivo* como *in vitro*.[43] La nano-terapia pretende dirigir nanosistemas activos que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o

zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios.[21] La medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas. [43]

La importancia de la nanotecnología farmacéutica para la terapia con fármacos reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de bajo peso molecular, así como macromoléculas como los péptidos, proteínas y genes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés. La nanotecnología farmacéutica se enfoca al desarrollo de formulaciones de agentes terapéuticos en nano-complejos biocompatibles entre los que se cuentan las nanopartículas, las nano-cápsulas, los sistemas micelares, los dendrímeros.[44]

Las nanopartículas pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional.[45]

II.IV NANOTECNOLOGÍA EN EL SUMINISTRO DE FÁRMACOS

Los micro y nanosistemas sintetizados a partir de materiales orgánicos e inorgánicos han adquirido gran interés en aplicaciones biomédicas; tales como diseños de biosensores y síntesis de acarreadores o dispositivos de liberación de fármacos sitio específicos, etc.[46]

En el diseño y formulación de sistemas de liberación, los parámetros clave, son el tamaño del dispositivo, método de cargado, estabilidad del fármaco, parámetros de degradación de la matriz y la cinética de liberación del fármaco.[47]

Los nanosistemas, tienen ventajas como la fácil penetración en los tejidos a través de capilares y membranas celulares, facilidad para ser captados por las células, demostrando alta eficacia terapéutica en el sitio diana, y sosteniendo el efecto en el sitio especifico por largo periodo de tiempo.[48]

El objetivo más importante para las liberaciones controladas de fármacos; es ofrecer la máxima efectividad terapéutica, mientras disminuyen los efectos secundarios del fármaco.[49]

El uso de nanopartículas parece representa una herramienta terapéutica atractiva para el suministro de fármacos antiinflamatorios a tipos de células específicas.

En particular, se han diseñado nanopartículas “pegiladas” que responden al pH, para aplicaciones biomédicas, tomando en cuenta que los tumores, la piel, y los endosomas/lisosomas presentan un pH más ácido comparado con el tejido normal (pH 7.4).[11]

II.IV.I Nanogeles termo-responsivos

El término “nanogel” define a las dispersiones acuosas de partículas a base de hidrogeles formadas física o químicamente por redes de entrecruzantes poliméricos, en la escala nanométrica.[50]

Los nanogeles ofrecen ventajas como sistemas poliméricos de liberación de fármacos: Un tamaño ajustable de nanómetros a micrómetros, una gran superficie para bioconjugación polivalente, y una red interior para la incorporación de las biomoléculas y fármacos (Figura 1).[51]

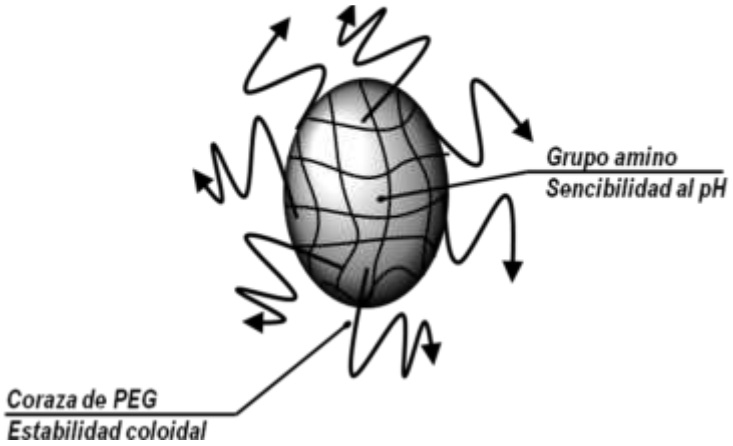


Figura I. Nanogel con coraza de PEG Copolimerizado con grupos amino sensibles al pH

La liberación del fármaco puede ser promovida en respuesta a alguno de los factores que se encuentran incrementados en los tumores y tejidos inflamados, tales como una temperatura incrementada y un menor pH que los tejidos normales, o una concentración elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS).[31,52]

Específicamente, los NGs inteligentes pueden responder a estímulos ambientales ya sea externos o internos como la temperatura, pH o luz, facilitando así la liberación controlada de fármacos en el destino deseado.[7,53]

II.V. POLIMERIZACIÓN

Un monómero es cualquier sustancia susceptible para polimerizar. La polimerización es una reacción química que da lugar a un polímero.[54] Se pueden encontrar varios tipos de polímeros, uno de los cuales es el homopolímero.[51] Este homopolímero es una macromolécula constituida por un solo tipo de unidades

químicas, pequeñas y simples (denominadas monómeros), las cuales están conectadas por enlaces covalentes.[7] Si en el polímero existe más de un tipo de unidad repetitiva, entonces a esta macromolécula se le denomina **copolímero,** estas unidades también se encuentran unidas por enlaces covalentes.[55]

La palabra polímero procede del griego y significa literalmente «muchas partes». En Ciencia y Tecnología se considera material polimérico a aquél que contiene muchas unidades enlazadas entre sí químicamente.[56]

Son sustancias de elevado peso molecular, desde miles a millones de gramos, y están constituidas por unidades idénticas de un compuesto sencillo (monómero); el cual se repite a lo largo de la cadena.[4] Existen polímeros de origen natural o biopolímeros como, por ejemplo: proteínas, celulosa, caucho, almidón, etc., y polímeros sintéticos. [57]

El diseño y la preparación de hidrogeles tienen gran interés en ingeniería biomédica, aplicaciones farmacéuticas en la liberación de fármacos y en las ciencias de biomateriales, ya que presentan estructuras químicas en tres dimensiones, excelentes propiedades mecánicas, alto contenido de agua y una alta biocompaiblidad.[58]

Existen varias estrategias sintéticas para la preparación de los nanogeles, en las cuales se incluyen los métodos fotolitográficos, micro molde, modificación de biopolímeros, polimerización heterogénea por radicales libres y la polimerización radicalizada controlada.[59]

II.VI. TIPOS DE POLIMERIZACIÓN

I. *Polimerización heterogénea por radicales libres*

El proceso de polimerización heterogénea (formación de partículas) es un sistema de dos fases en el cual el monómero y/o el polímero forman una fina dispersión en un líquido inmiscible y el iniciador de la polimerización puede ser soluble en el monómero (fase dispersa) o en el medio de polimerización (fase continua).

II. *Polimerización en suspensión*

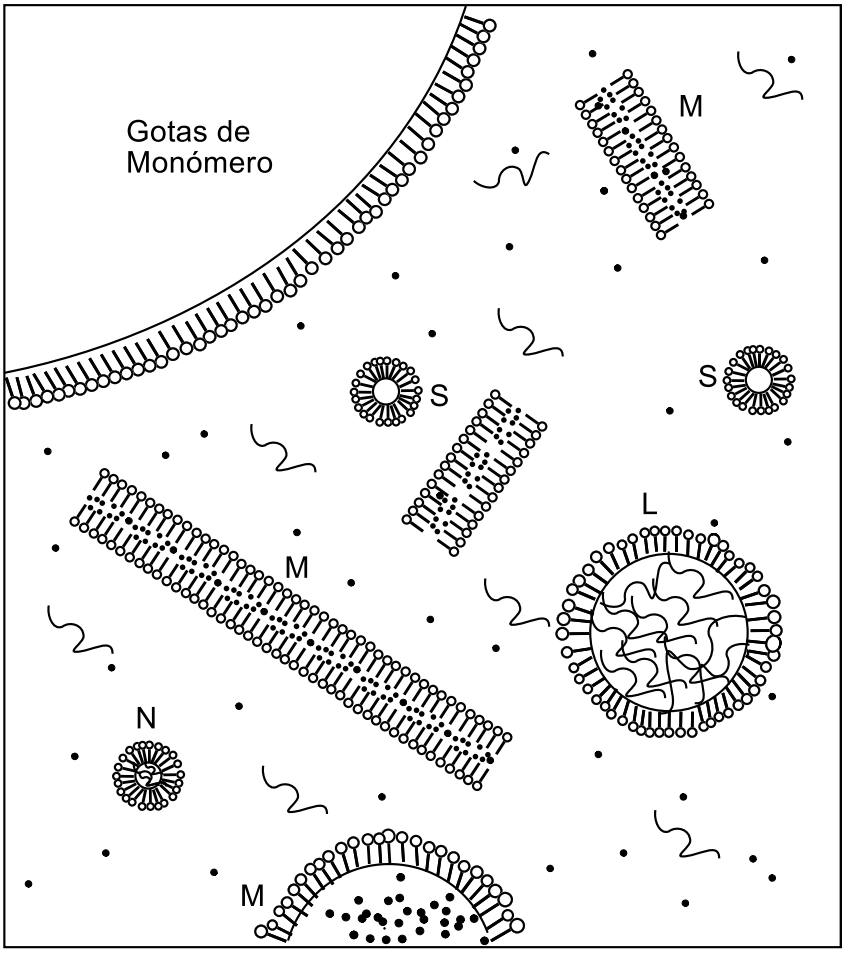
En el método de polimerización en suspensión, el iniciador es soluble en el monómero y estos son insolubles en el medio de polimerización. La relación de volumen entre la fase dispersa y la fase continua se mantiene en 0.1-0.5, pero en principio puede ser tan alta como la unidad o incluso más. En este método, la fase dispersa es suspendida en el medio en forma de pequeñas gotas (microgotas) por medio de un agitador y un agente estabilizador. La polimerización se inicia a temperaturas entre 20 y 100°C, completándose la reacción al 100%.

III. *Polimerización en dispersión*

La polimerización en dispersión es una técnica que permite la preparación de partículas en la escala micrométrica y con distribuciones angostas de tamaños. Para la reacción de polimerización en dispersión se incluyen ingredientes como el monómero y el iniciador solubles en la fase continúa compuesta por solventes orgánicos.

IV. *Polimerización en emulsión*

En una polimerización en emulsión, el monómero es insoluble en la fase continua, pero ocurre la emulsificación por medio de un tensoactivo o detergente. El iniciador es soluble en el medio, pero no en la fase dispersa, bajo estas condiciones, el monómero está presente parcialmente en la mezcla en forma de gotas de aproximadamente de 1 a 10μm de longitud, aunque un porcentaje pequeño del monómero se disuelve también en el medio; y parcialmente en forma de micelas cubiertas de detergente (ca.50-100 A°) dependiendo la concentración del emulsificante. La relación de volumen entre las fases, por lo general es 0.1-0.5 y la polimerización se lleva de 40 a 80°C. La mezcla para la polimerización en fase inicial de la emulsión se representa en la Figura 2.



●= Monómero M= Micelas que contienen monómeros

S= Micelas de detergente Macroradicales en crecimiento

N= Núcleo polimérico L= Látex en crecimiento

Figura II. Esquema de la primera fase de la polimerización en emulsión.

V. Polimerización en emulsión sin detergente

La polimerización en emulsión sin detergente es una polimerización en emulsión, pero sin utilizar tensoactivos. Se piensa que el método se desarrolla en cuatro etapas (Figura 3): durante de la primera etapa, el medio de polimerización es acuoso, donde uno de los monómeros es soluble en el

medio y el otro monómero es hidrofóbico, el cual forma la fase dispersa; en la segunda etapa, el monómero hidrofóbico es primeramente polimerizado, posteriormente comienzan a crecer cadenas de segmentos hidrofóbicos dependiendo del radio de reactividad entre el monómero hidrofóbico y el monómero hidrofílico en el medio acuoso. En la tercera etapa, los radicales del polímero son naturalmente estabilizados por la formación de micelas de autoensamblaje en agua, después del crecimiento del peso molecular debido a la selectividad y miscibilidad, donde las cadenas hidrofóbicas activadas son recogidas en el núcleo y las cadenas hidrofóbicas emanan del núcleo. En la última fase, la polimerización procede dentro del núcleo de las micelas. Por lo tanto, se puede obtener microesferas poliméricas con tamaños de distribución desde los 100 nm hasta 1µm.[46] En la polimerización en emulsión sin detergente, la estabilidad de las microgotas de monómero, dependen de la absorción de las moléculas del iniciador (incluyendo los iones) o del monómero hidrofílico

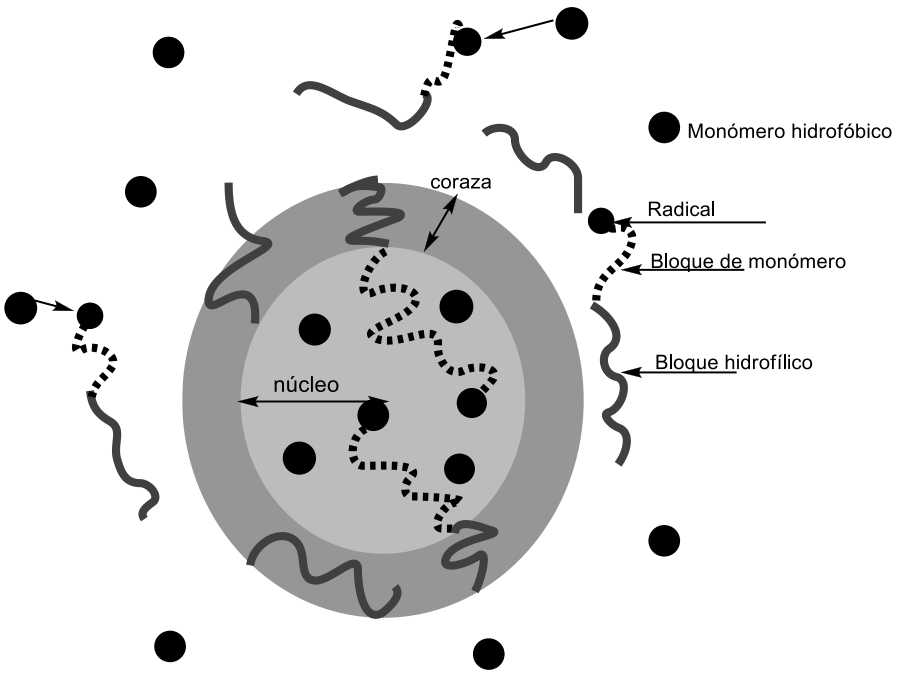


Figura III. Esquema de la polimerización en emulsión sin detergente.

VI. *Polimerización núcleo-coraza*

La formación de partículas núcleo-coraza por polimerización heterogénea es superficialmente similar a la polimerización en emulsión. Para la formación de la coraza alrededor de un núcleo, por polimerización directa, se deben tomar estrictamente las siguientes condiciones de polimerización:

1) Las partículas del núcleo no deben hincharse en el monómero;
2) La coraza de las partículas debe formarse o precipitarse en la superficie del núcleo;
3) Los segmentos del núcleo y de la coraza no deben difundirse unos con otros (deben ser inmiscibles).

Una estructura núcleo-coraza ideal puede obtenerse por unir cadenas de polímero preformadas en la superficie del núcleo. El proceso de formación núcleo-coraza es complicado, y depende de los detalles exactos de las condiciones experimentales, tales como la difusión del monómero en las semillas y la miscibilidad de los dos polímeros. [43,50]

II.VI. I. POLIMEROS SENSIBLE A ESTÍMULOS

Los polímeros están encontrando cada vez mayores aplicaciones en el área de los biomateriales. Los polímeros se pueden aplicar, por ejemplo, en prótesis, en ingeniería de tejidos, área farmacéutica y médica. El uso de polímeros e hidrogeles que sean sensibles, por ejemplo, a cambios térmicos o de pH del medio en que se encuentran es de particular interés, debido a que esta propiedad permite el diseño de materiales, los cuales pueden responder a un cambio en las condiciones medioambientales mediante un cambio abrupto de sus propiedades fisicoquímicas.[60]

Los polímeros sensibles a estímulos son sistemas poliméricos que modifican sus propiedades en respuesta a pequeños cambios en su entorno. Los más importantes desde un punto de vista biomédico son aquellos sensibles a la temperatura y/o al pH. Los sensibles a la temperatura, como los derivados de N-isopropilacrilamida-NIPAAm.[61] Se caracterizan por presentar un particular balance hidrofílico-hidrofóbico en su estructura. Pequeños cambios cercanos a la temperatura crítica provocan el colapso o expansión de las cadenas

macromoleculares en respuesta a reajustes de las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas en medios acuosos.[58] Por su parte los sensibles al pH se caracterizan por tener grupos ionizables en su estructura -tanto ácidos como básicos de carácter débil-, que en el proceso de ionización pasan de sistemas ovillados a cadenas extendidas como respuesta a las repulsiones generadas por las cargas, aniones o cationes.[50]

II.VI.II POLÍMEROS INTELIGENTES

Los polímeros inteligentes son aquellos que responden a cambios en una propiedad a pequeños estímulos físicos o químicos. Estos polímeros pueden estar en varias formas, tales como en solución, en superficies o como sólidos. Existen diversos estímulos que pueden ser aplicados: temperatura, pH, iones, campo eléctrico, disolventes, entre otros.[62]

Un polímero es una gran molécula constituida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples llamadas monómeros. En algunos casos la repetición es lineal, de forma semejante a como una cadena la forma sus eslabones.[63]

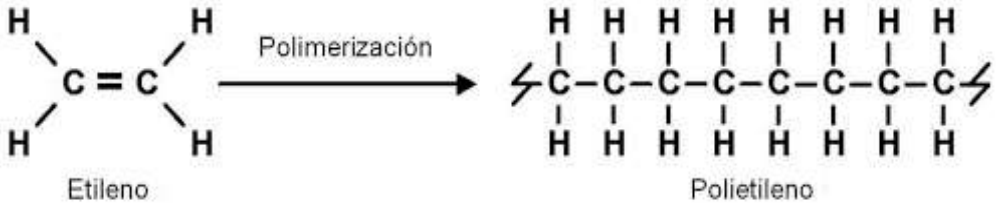


Imagen IV. Ejemplo de un monómero siendo polimerizado para convertirse en un polímero

II.VII. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

En la nanotecnología, la nano-farmacia se podría definir como el uso de la nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y heridas, así como para mejorar la salud y funcionamiento del organismo humano y de otros seres vivientes. Las aplicaciones de la nano-farmacia incluirían el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos, el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos con localización o direccionamiento específico.[64]

Una de las aplicaciones de la nano-farmacia o nanotecnología farmacéutica que más promete es la encapsulación de fármacos para dar dirección o localización al sistema de suministro de fármacos.[64,65]

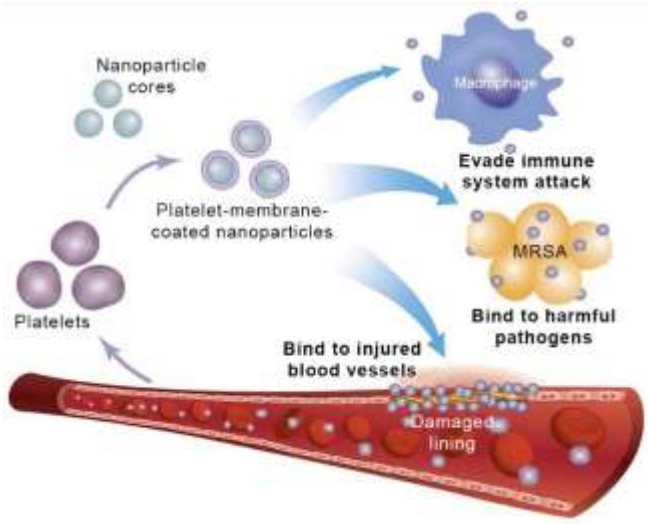


Imagen V. Administración de fármacos dirigida específicamente.

II.VII.I CARGADO DE NANOGELES CON FÁRMACOS Y BIOMOLECULAS

Existen diferentes estrategias para la incorporación de fármacos y agentes biológicos dentro de los nanogeles; una de las propiedades más importantes para

este fin, es el hinchamiento de los nanogeles. Por otra parte, se han estudiado diversos métodos para el cargado; por atrapamiento físico, conjugación covalente y autoensamblaje controlado.[59]

En el método por atrapamiento físico la sustancia activa se pone en contacto con el monómero y con el entrecruzante antes de la síntesis del gel, de manera que a medida que se forma la red, el fármaco queda atrapado en los poros de la misma. Esta técnica requiere que el tamaño del poro sea menor que el fármaco para evitar que se salga del gel.[7,39]

II.VIII. SISTEMAS DE LIBERACIÓN

La velocidad de liberación del fármaco depende, en cada caso específico, de la solubilidad del fármaco, su desorción si está unido a la superficie del portador, de la velocidad de hinchamiento de la matriz por el penetrante acuoso y de la velocidad de difusión del fármaco ocluido en una matriz hinchada y de la velocidad de degradación de la matriz si esta es degradable Por lo tanto, la solubilidad, la difusión y la biodegradación de las partículas de la matriz o su velocidad de hinchamiento con agua rigen el proceso de liberación.[29,46]

II.VIII.I PRINCIPIOS DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS EN NANOGELES.

El control de los fármacos administrados en el cuerpo humano, mejor la eficacia de la terapia médica y permite nuevos tratamientos farmacológicos. Se han logrado patrones bien definidos de liberación sostenida de fármacos, los cuales mantienen niveles del fármaco en el cuerpo humano sin inducir efectos secundarios.[66]

Los agentes biológicos y los fármacos pueden liberarse de los nanogeles a través de:[58,67]

a) Difusión simple
b) Degradación del nanogel
c) Cambios del pH
d) desplazamiento por contraiones presentes en el medio
e) Transición inducida por una fuente externa de energía.

Los nanogeles proporcionan los medios para superar en eficiencia este tipo de sistemas de liberación. Por ejemplo, la liberación del fármaco puede decrecer por las cadenas de entrecruzante del nanogel, se puede ajustar y hacerlo sensible a cambios del medio ambiente requerido. Los nanogeles hidrofílicos se hinchan mientras se libera el fármaco, así mismo, el nanogel debe sostener la liberación del fármaco desde sus capas internas; esto puede ser utilizado para modificar o eliminar la liberación o incluso para alcanzar la cinética de orden cero del fármaco liberado al sitio deseado.[74,94]

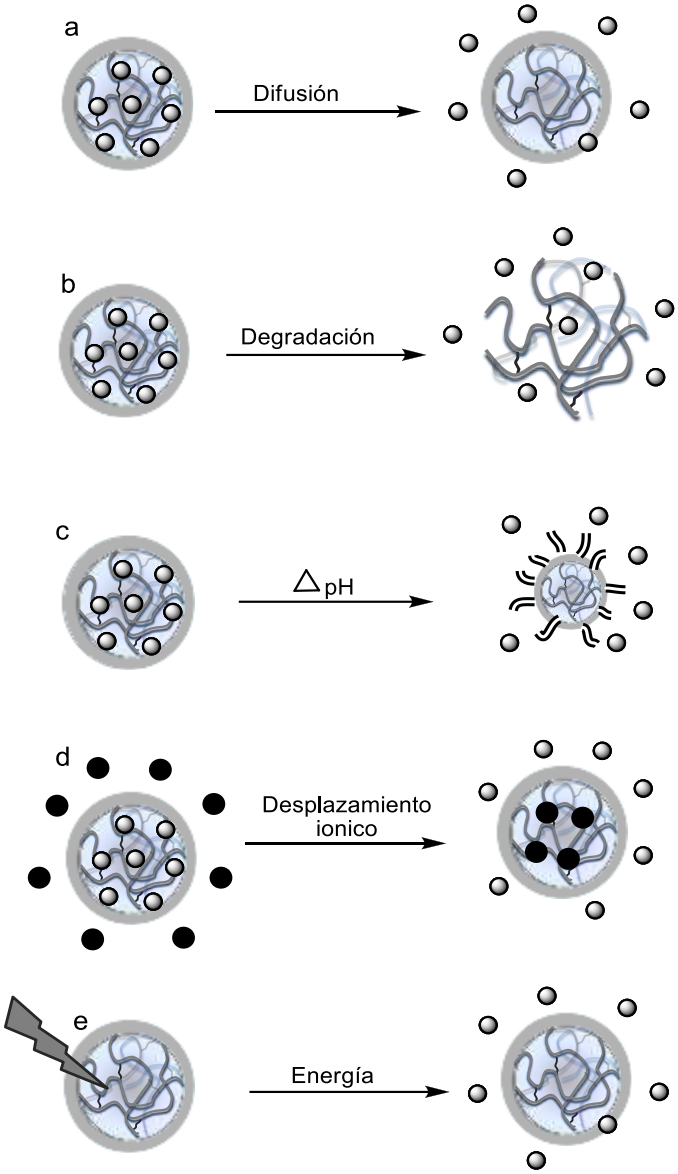


Figura IV. Liberación de fármacos a partir de nanogeles. a) Difusión del fármaco a partir de nanogeles. b) Liberación de fármacos a través de la degradación de las cadenas del entrecruzante biodegradable. c) Un cambio en el pH promueve una deionización de la red polimérica y la liberación de los enlaces electrostáticos entre el nanogel y el fármaco. d) Cationes Multivalentes de bajo peso molecular o poli iones de carga positiva o negativa, pueden desplazar a los fármacos con carga similar a partir del complejo electrostáticos con una nanogel ionico. e) Liberación del fármaco por la aplicación de energía externa a los nanogeles, la cual induce a la degradación o transición estructural de las cadenas poliméricas del nanogel.

II.IX. TOXICIDAD DE NANOMATERIALES.

La Nanotoxicología, caracteriza y cataloga los efectos tóxicos causados por los nanomateriales (NMs) (Marquis et al., 2009). Esta ciencia pretende entender, predecir y prevenir los riesgos que presentarían la utilización de estos nuevos materiales.

Existen diversos factores que influyen en la toxicidad de las nanopartículas (NPs) (Fig…), un menor tamaño de NP provocó mayor toxicidad (Lin et al., 2014), otro factor es la forma de la NP, lo que se relacionó con la interacción con la célula (Tong et al., 2013).

Los mecanismos de toxicidad entre las NPs en los sistemas biológicos aún no son claros totalmente y esto es por los diferentes factores de toxicidad que se deben de tomar en cuenta (Figura XXX) (Chang et al., 2012; Ray et al., 2009).

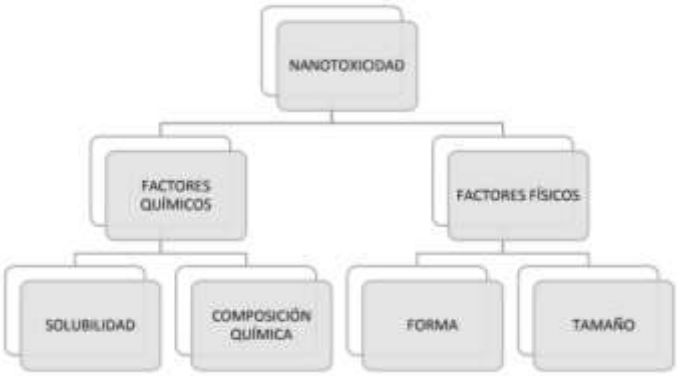


Figura IV. Factores que influyen en la toxicidad de las nanopartículas

II.IX.I MECANISMOS DE TOXICIDAD.

Los mecanismos de toxicidad pueden cambiar de una NP a otra, por la capacidad de unión e interacción con los componentes en los sistemas biológicos (materia biológica, proteínas, etc.) (Ray et al., 2009). Los mecanismos de toxicidad más relevantes son: la disolución de las NPs, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y el daño a la membrana.

Disolución de iones; Un factor importante de la toxicidad de las NPs, es la composición química de las NPs. Algunos metales se pueden disolverse muy fácilmente en medios biológicos, y esto ocasiona el efecto toxico, es decir, la toxicidad es ocasionada por la ionización de las NPs. En este caso, la toxicidad se presentó porque el ion puedo penetrar a la célula por su carga, interaccionando con los componentes de le membrana celular, como por ejemplo los extremos carboxilo, amino e hidroxilo de proteínas y carbohidratos, causando un daño a los organelos y a las funciones metabólicas principales de la célula, teniendo como consecuencia la muerte celular (Chang et al., 2012; Suresh et al., 2013).

Daño a la membrana; Las características de los modelos biológicos estudiados, presentaron diferencias en la composición de las membranas celulares, la cual está diseñada para proveer fuerza, rigidez, forma y proteger de daños mecánicos y cambios osmóticos a la célula. La interacción de las NPs con la membrana de la célula se lleva a cabo por medio de interacciones electrostáticas y la disrupción de la integridad de la membrana (Thill et al., 2006).

Producción de especies reactivas de oxígeno; En la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocaron daño en la estabilidad de las membranas

ya sea directamente provocando un daño físico o indirectamente provocando oxidación, produciendo la muerte celular (Chang et al., 2012).

II.X. BIOMATERIALES FLUORESCENTES

II.X.I Administración de medicamentos por imágenes

Al administrar agentes farmacológicamente activos de manera más eficaz y selectiva en el sitio y/o evitando la interacción en los tejidos sanos que podrían ser potencialmente en peligro, los nanomedicamentos tienen como objetivo mejorar el equilibrio entre la eficacia y la toxicidad de las intervenciones terapéuticas sistémicas.[68]

La orientación de fármacos a sitios específicos de acción y con fines terapéuticos, las formulaciones de nanomedicina también se han utilizado cada vez más para aplicaciones de imagen y, en los últimos años, para enfoques teranósticos, es decir, para sistemas y estrategias en los que el diagnóstico y la terapia de enfermedades son conjunto.[68]

II.X.II Nanopartículas teranósticas

Ha habido un interés considerable en el empleo de materiales biocompatibles de tamaño nanométrico que sean tanto de diagnósticos como terapéuticos, denominados **nanoteranóstica**. La elección de proporcionar funciones terapéuticas y de diagnósticos en un solo paso surge del deseo de eludir las diferencias en la Biodistribución y la selectividad que acompañan con frecuencia al empleo de

distintos agentes diagnósticos y terapéuticos, y de explotar las funcionalidades superpuestas existentes. [69]

Con esto facilitar los análisis farmacocinéticos y de biodistribución y, por lo tanto, mejorar la orientación de los fármacos a los sitios patológicos, sería muy útil si el tiempo de circulación y la acumulación de órganos de las formulaciones de nanomedicina pudieran visualizarse de forma no invasiva en tiempo real. Para lograr esto, muchos tipos diferentes de nanomedicinas se han co-cargado tanto con fármacos como con agentes de formación de imágenes.

La multifuncionalidad de los nanovehículos que crean plataformas nanoteranósticas ofrece una serie de ventajas sobre los agentes convencionales y son herramientas poderosas para la obtención de imágenes y el tratamiento de diversas patologías. Estos incluyen dirigirse a un sitio enfermo, minimizando así la toxicidad sistémica; la capacidad de solubilizar fármacos hidrófobos o lábiles, lo que conduce a una farmacocinética mejorada; y su potencial para generar imágenes, tratar y predecir los efectos terapéuticos.

II.X. III Biomateriales fluorescentes

El **término marcador fluorescente** se utiliza para los compuestos cuya presencia permite visualizarlo, y se utilizan por tanto como agentes de identificación, contraste o tinción. Cuando esta molécula está unida covalentemente a alguno de los componentes del sistema, se le denomina etiqueta fluorescente.[70]

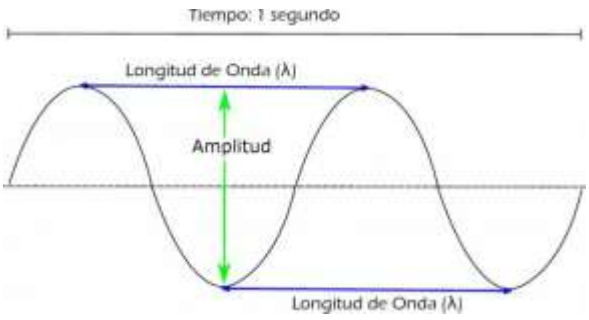
Los **sensores fluorescentes** son aquellas moléculas que sufren cambios en su emisión de fluorescencia en respuesta a un estímulo específico. Los cambios se

producen en propiedades como la polaridad, rigidez, pH, viscosidad, presión, temperatura, potencial eléctrico o movilidad molecular del medio.[71] Como consecuencia de la fuerte influencia del medio circundante en la emisión de fluorescencia, las moléculas fluorescentes se utilizan como sondas para la investigación de sistemas fisicoquímicos, bioquímicos y biológicos.[72]

II.X. IV Luminiscencia

La luminiscencia es la emisión de luz que se produce desde los estados electrónicamente excitados de cualquier sustancia excitada por la absorción de un fotón de luz.[73]

La luz es una forma de radiación electromagnética, usualmente una mezcla de ondas con diferentes longitudes de ondas. La longitud de onda (λ) es definida como la distancia entre dos crestas de una onda.[74]



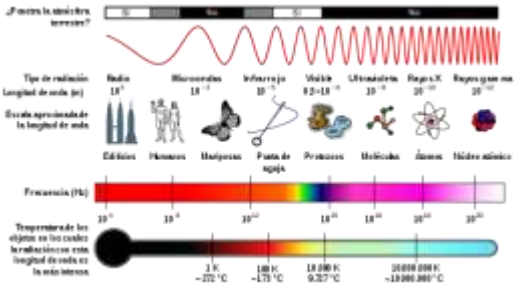


Figura V. Representación del espectro de luz a diferentes longitudes de onda. El ultravioleta (UV) abarca aproximadamente hasta 400 nm, el visible de 400 a 750 nm y el infrarrojo a partir de 450 nm.

II.X. V Fluorescencia y fosforescencia

La fluorescencia y la fosforescencia son dos casos particulares de luminiscencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado desde el que se producen. Los procesos que se producen entre la absorción y la emisión de luz se suelen esquematizar en el diagrama de Jablonski (Imagen X).[75]

El fenómeno de fluorescencia se caracteriza por un proceso de absorción de radiación pasando la molécula a un estado excitado y para relajarse puede trasferir energía como calor o bien emitiendo radiación a una mayor longitud de onda (él tiene menor energía.[76]

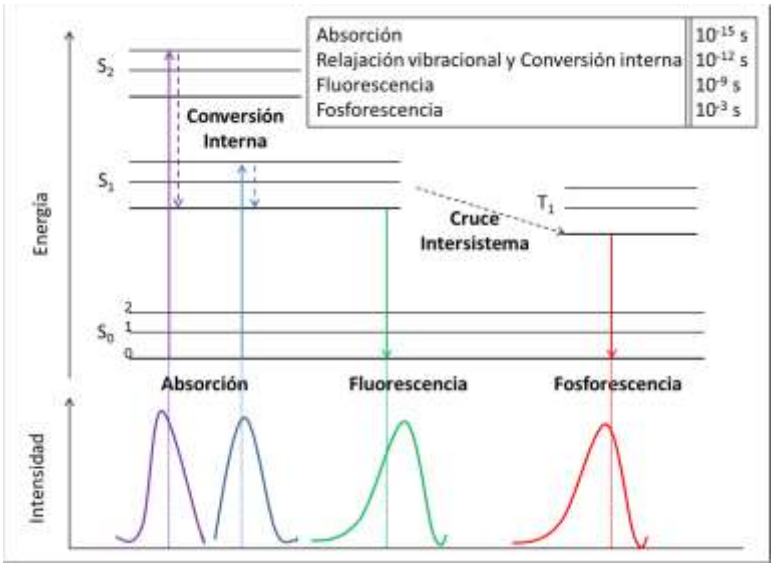


Imagen VI. Diagrama de Jablonski.

La imagen V ilustra el proceso involucrado en la creación de un estado excitado singlet por absorción óptica y subsecuente emisión de fluorescencia. Los estados

basales, primer excitado singlet y segundo excitado singlet se representan con *So*, *S1* y *S2*, respectivamente.[77]

Las transiciones entre los estados se dibujan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz.[76]

(a) Las líneas horizontales numeradas denotan los niveles vibracionales.

(b) 1: Excitación; 2: Conversión interna; 3: Emisión por fluorescencia

CAPITULO III
METODOLOGÍA

III. MATERIALES

NIPAAm (TCI, 98%) se purificó por recristalización en hexano. Se destiló al vacío (45 °C, 5 mm Hg) metacrilato de 2-dimetil(aminoetilo) (DMAEMA, Sigma-Aldrich) para eliminar el inhibidor. El dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) (Aldrich) se purificó pasándolo a través de una columna de removedor de hidroquinona de Sigma-Aldrich, el persulfato de amonio (APS) (Aldrich, 98 %), se usó tal como se recibió, 3,9-divinil-2,4 ,8,10-tetra oxaespiro [5.5] undecano (DVA, 98%), metacrilato de poli(etilenglicol) metil éter (PEGMAM), Mn = 1100 g/mol, 1500 g/mol y 4000 g/mol). Se prepararon soluciones tampón de fosfato (pH 5, pH 6,8 y pH 7,4) a una concentración total de 0,05 M.

III.I. SÍNTESIS DEL MONÓMERO FLUORESCENTE (METACRILATO DE FLUORESCEÍNA).

En un vial de 20 mL, se adicionaron 50 mg de clorhidrato de N-(3-aminopropil) metacrilamida (MCA) y 2 mL de trietilamina (TEA) en agitación constante. Posteriormente en un vaso de precipitado de 10 mL se pesaron 0.1355g de isocianato de fluoresceína (FITC) y se le adicionaron 2 mL de diclorometano en agitación hasta disolver, a la solución de FITC se le añade la solución de MCA. La mezcla se dejó en agitación constante por 4 horas confirmando la eliminado el HCl mediante una cromatografía de capa fina. En un embudo de separación se agregó el producto y se le adiciono acetato de etilo, se mezcla y se mide el pH. El producto de la síntesis debería tener un pH entre 4 y 5 para que el monómero sea

recuperable. El pH se ajustó con agua ligeramente ácida: En 5 mL de agua se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), el pH de esta solución ácida debe ser entre 2 y 3 si es necesario se debe agregar más agua hasta obtener el pH correcto. Posterior al ajuste del pH se separan las dos fases, el producto final se encuentro en la fase orgánica. Se eliminó el disolvente por rota evaporación para la obtención del monómero final libre de solventes.

III.II. CARACTERIZACIÓN DE MONÓMERO FLUORESCENTE

Para la caracterización de los monómeros se usaron diferentes métodos que aseguraron la obtención de este tipo de monómero, además de aseguro su pureza para su uso en la síntesis de nanogeles. Dichos métodos son: espectrofotometría de infrarrojo y resonancia magnética nuclear (RMN).

- **Espectrofotometría de infrarrojo**

El espectro de infrarrojo se obtuvo con el equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), por método directo a temperatura ambiente, usando el software OMNIC 09/02/41.

- **Resonancia magnética nuclear.**

La resonancia magnética nuclear de protón se realizó por el equipo Varían Mercury NMR de 200 MHz. Se toman entre 10 y 15 mg de muestra, y se disolvieron en cloroformo deuterado, dentro del tubo de RMN.

III.III. SÍNTESIS DE NANOGELES FLUORESCENTES

Para realizar la síntesis se mezclaron los monómeros correspondientes NIPAAm:PEGMA:DEAEM 47:41:12 w%, como entrecruzante EGDMA/DVA (3 mol% con respecto a NIPAAm), en 50 mL de agua destilada en un matraz Schlenk de 100 mL. Se removió el oxígeno mediante burbujeo de hidrogeno. La solución desoxigenada se calentó en baño de aceite a 85 °C, una vez alcanzada la temperatura de reacción se añadió el iniciador (APS). Se determino la concentración óptima para la síntesis, así como la temperatura y el tiempo de reacción. Dentro de las variables que se estudiaron están la proporción de los biomateriales, proporción y tipo de entrecruzante, proporción de iniciador, concentración y tipo de monómeros ácidos y/o básicos (Tabla X).

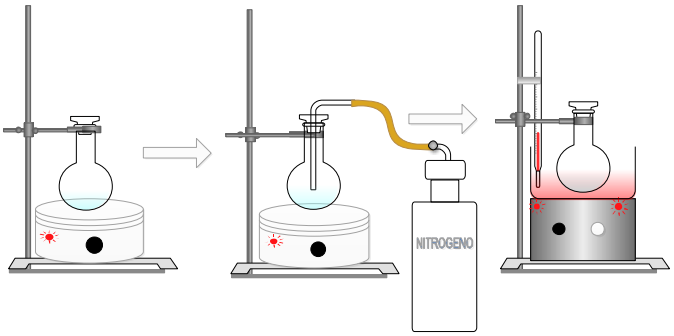


Figura V. Síntesis de biomateriales

Tabla I. Concentraciones y entrecruzantes utilizados en las síntesis de nanogeles

Monómero-Comonómero		**Co-adyudante**	**Entrecruzantes**		**Iniciador**
NIPAAm W%	DEAEM W%	PEGMA W%	DVA %mol	EGDMA %mol	APS %mol
47%	12%	41%	5%	5%	2%
			10%	10%	

III.IV. TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA LOS NANOGELES SINTETIZADOS

Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Se utilizó el equipo de Dispersión de Luz Dinámica con la finalidad de caracterizar la formación y el tamaño de los nanogeles en las emulsiones obtenidas.

Potencial Z. Se utilizó el equipo DTS nano para analizar el potencial z con la finalidad de determinar la carga de la superficie de los nanogeles. Se tomaron 100 µl de las emulsiones previamente purificadas y se diluyeron en 10 ml de buffer de diferentes pH (de 3 a 10); cada una de las diluciones se colocaron en cubetillas para posteriormente analizar el potencial Z.

Estudio del efecto del pH y la temperatura en el tamaño de las nanogeles. Se determina el efecto de la temperatura y el pH medio dispersando los biomateriales en soluciones amortiguadoras de diferente pH, fijando la fuerza iónica y determinando el tamaño partícula a diferentes temperaturas usando el Zetasizer Nano NS.

III.V. LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES

Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado a todos los nanogeles sintetizados, con la finalidad de aplicarlos la parte experimental de cargado y liberación de fármacos, analizando las modificaciones y/o la estabilidad en su morfología, su estructura y su radio hidrodinámico.

- **Liofilización**

Se tomaron 35 mL de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas, se congelaron en viales de LabConco, posteriormente se colocaron en el liofilizador por cuatro días para obtener las muestras completamente secas. Se obtuvieron las emulsiones liofilizadas y se observó como un polvo blanco esponjoso.

- **Reconstitución**

Para reconstituir el material esponjoso, en un vial se adicionaron 100 mg del polvo liofilizado en 10 ml de agua destilada y filtrada bajo agitación constante por 5 horas. Obteniendo la emulsión reconstituida, se tomaron 100 µl y se diluyeron en 10 ml de agua. Se realizó la caracterización de las muestras reconstituidas vía DLS de acuerdo con el método anteriormente descrito en la sección IV, haciendo un barrido de temperaturas de 20 a 50°C, para observar los cambios de los nanogeles con respecto al proceso de liofilización y reconstitución.

III.VI. CARGADO DE LAS NANOGELES CON INDOMETACINA

- ***Método de equilibrio:*** Los nanogeles fueron dispersados en agua 40mg/19ml, en agitación constante por 48 horas, el fármaco fue disuelto en etanol 20mg/1ml.

La solución del fármaco se añade gota a gota a la solución de los nanogeles en agitación constante por 48 horas. La solución resultante se colocó en una membrana de diálisis semipermeable con un corte de PM 12,000-14,000 Dlt en agitación constante con agua desionizada, se realizaron cambias de agua cada hora las dos primeras horas, los nanogeles cargados se congelaron y se liofilizaron, y determino el porcentaje (%) de cagado.

- ***Determinación de la capacidad de carga de los nanogeles.*** La muestra liofilizada se resuspendió en agua en agitación constante por 2 horas y se colocó en baño ultrasónico por 15 minutos. Se realizó una curva de calibración y se analizó la solución mediante espectroscopia UV-VIS a la longitud de onda correspondiente (319 nm para indometacina).

$$DL\% = \frac{MDngs}{Masa\ de\ nanogeles + MDngs} * 100$$

$$EE\% = \frac{MDngs}{MD} * 100$$

- Donde **MD** es la masa de fármaco (IND) y **MDngs** es la masa de fármaco en el nanogel.

- ***Estudios de liberación.*** La liberación se llevó a cabo a partir de una dispersión recién preparada de los nanogeles cargados, colocada dentro de una membrana de diálisis semipermeable, la cual se colocó dentro del medio de liberación (buffer 7.4, y 6.8) en un oscilador de temperatura constante a 37°C. En periodos predefinidos de tiempo se tomaron muestras del medio y se evalúo

la concentración de fármaco en la solución por los métodos indicados anteriormente.

- ***Curva de calibración de IND por UV-VIS:*** Se realizó una curva de calibración para el análisis del cargado con Indometacina, utilizando una solución madre compuesta de ETHO:INDO 1:1 con una concentración de 1mg/ml y las muestras a diferentes diluciones para obtener concentraciones en la escala de µg/mL. Los análisis de control de proceso del fármaco se realizaron empleando el espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Coulter DU520) con las siguientes condiciones: cubetas de cuarzo paso óptico de luz a 1cm, con una longitud de onda de 319 nm y las soluciones blancas de ETHO.

III.VII Estudios de citotoxicidad *in vitro*

- ***Cultivos celulares.*** Para realizar los experimentos en cultivo celular, se realizó el estudio de citocompatibilidad en la línea celular de fibroblastos embrionarios murinos BALB / 3T3 (ATCC CCL - 163).
- ***Ensayo de citotoxicidad in vitro.*** Las pruebas fueron realizadas en placas de 96 pocillos donde se colocaron 2500 células por mL, utilizando medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, 1% de solución de penicilina/estreptomicina. La placa se colocó en incubación por 12 horas, una vez transcurridas a las células se añadieron en serie las concentraciones (0.2, 2 y 20 mg/ml) de nanopartículas las cuales fueron re-suspendidas con anterioridad, se colocaron en una atmosfera humidificada con 5% CO 2 y 37 °C por 24 horas. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento

y tratamientos sin células, todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

- ***Ensayo de viabilidad celular.*** Se utilizó el kit MTT (Roche, Suiza) para cuantificar la proliferación celular, por último, se obtienen las absorbancias por medio de un lector de microplacas a una longitud de onda de 620nm Multiskan FC, Thermo Scientific, (Waltham, MA, EE. UU.). Se calculó la viabilidad celular usando la siguiente ecuación:

III.VIII. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VIVO* DE LA INDOMETACIONA EN MODELOS DE RATA.

- **Inducción del edema con carragenina.**

Se seleccionaron 2 grupos de ratas wistar de 5 individuos cada uno, uno para inducir edema en las patas traseras por medio de carragenina al cual llamamos grupo 1 y el otro grupo se utilizó como control negativo, el cual fue el grupo 2. Los animales del grupo 1 recibieron una inyección subcutánea de 0.1 mL de carragenina al 1% en la superficie plantar de la pata trasera derecha. Los animales del grupo 1 recibieron una inyección subcutánea de 0.1 mL de solución salina en la superficie plantar de la pata izquierda.

Para evaluar el proceso edematogénico se analizó el volumen de la patas trasera en diferentes puntos de tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5 h) después de la inyección de carragenina haciendo uso de un pletismómetro digital. El volumen del edema en mililitros se define como la diferencia entre la pata derecha y la pata izquierda de

cada medición. Los animales del grupo 1 y 2 se mantuvieron en las mismas condiciones de alimentación, y temperatura en un ambiente controlado.

- **Análisis del efecto antinflamatorio de los nanogeles de indometacina en ratas wistar.**

  Se seleccionaron 10 animales divididos en 2 grupos de 5 ratas cada uno. El grupo 1 sirvió para la evaluación del efecto antiinflamatorio en presencia del nanogel de ácido salicílico. El grupo 2 sirvió como control negativo del desarrollo experimental. Los animales recibieron una inyección subcutánea de 0.1 mL de carragenina. Se seleccionaron 2 de los animales del grupo 1 y estos recibieron una inyección subcutánea de 1 mL del nanogel de ácido salicílico post inducción de carragenina. Se seleccionaron 2 de los animales del grupo 1 y recibieron una inyección subcutánea de 2 mL del nanogel de ácido salicílico post inducción de carragenina. Se analizo el efecto de los animales tratados con el nanogel por medio de las lecturas en el pletismómetro.

- **Efecto de la formalina como agente nociceptivo.**

  Se seleccionaron 10 ratones para el análisis de receptores nociceptivos por medio de la formalina. 6 ratones recibieron 20 µl de formalina en 1% de solución salina en la superficie plantar de la pata trasera derecha. Se analizo y observo el tiempo en que los ratones manifiestan efecto al acicalarse la zona afectada, se contabilizo el tiempo y las veces en acicalarse la zona afectada en un periodo de tiempo de 0-5 minutos. De 15-30 minutos se analizó la fase inflamatoria 2 ratones fueron utilizados como control negativo donde únicamente continuaron siendo observados. Los 5 ratones que fueron inyectados con formalina recibieron el

tratamiento experimental de nanogel de ácido salicílico. 2 ratones recibieron inyección de 1 mL del nanogel de ácido salicílico post inyección de formalina. 2 ratones recibieron 2 mL del nanogel de ácido salicílico post inyección de formalina. 2 ratones recibieron 1 mL del nanogel de ácido salicílico previo a la inyección de formalina. Se analizo el volumen de las extremidades por medio del pletismómetro.

- **Determinar la concentración mínima de nanogeles con efecto antiinflamatorio.**

  Se analizo el efecto de las diferentes concentraciones del nanogel de indometacina en los diferentes experimentos realizados. Se analizo estadísticamente los resultados obtenidos y elaborar conclusiones estadísticas. Conocer la mínima concentración del nanogel que pudieran presentar efectos significativos en los estudios realizados.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.I. SÍNTESIS DE METACRILATO DE FLUORESCEÍNA

En el resultado final de la síntesis del monómero se obtuvo un sólido rojizo con peso final de 54 mg y un rendimiento aproximado de 85%. En la imagen XI, se muestra su estructura final.

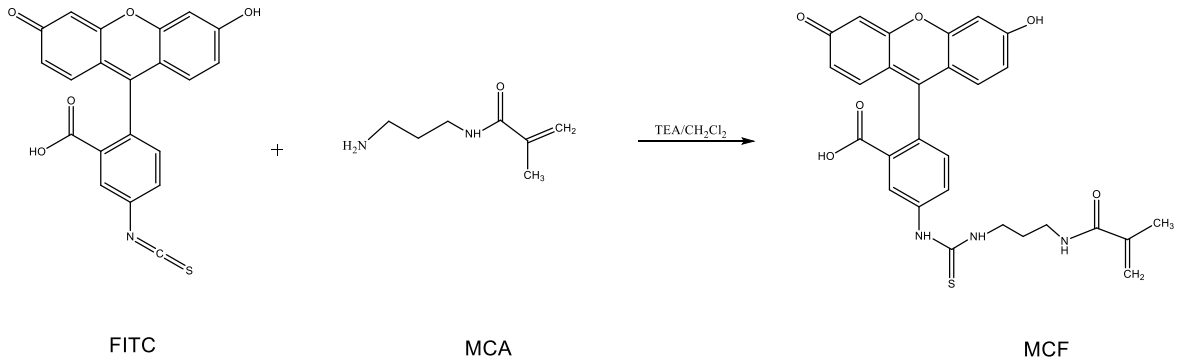
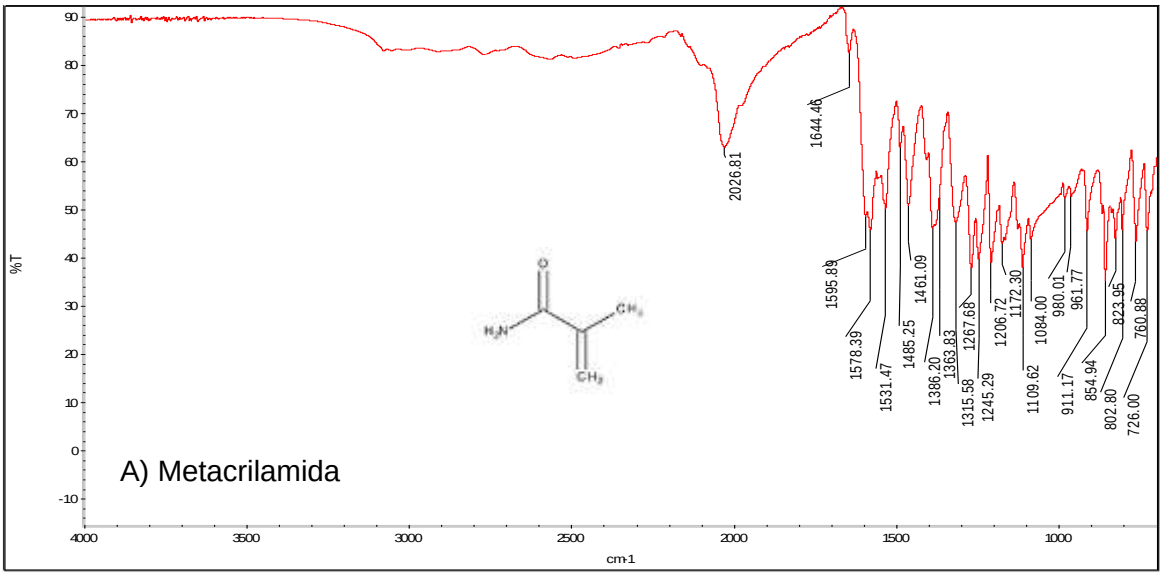
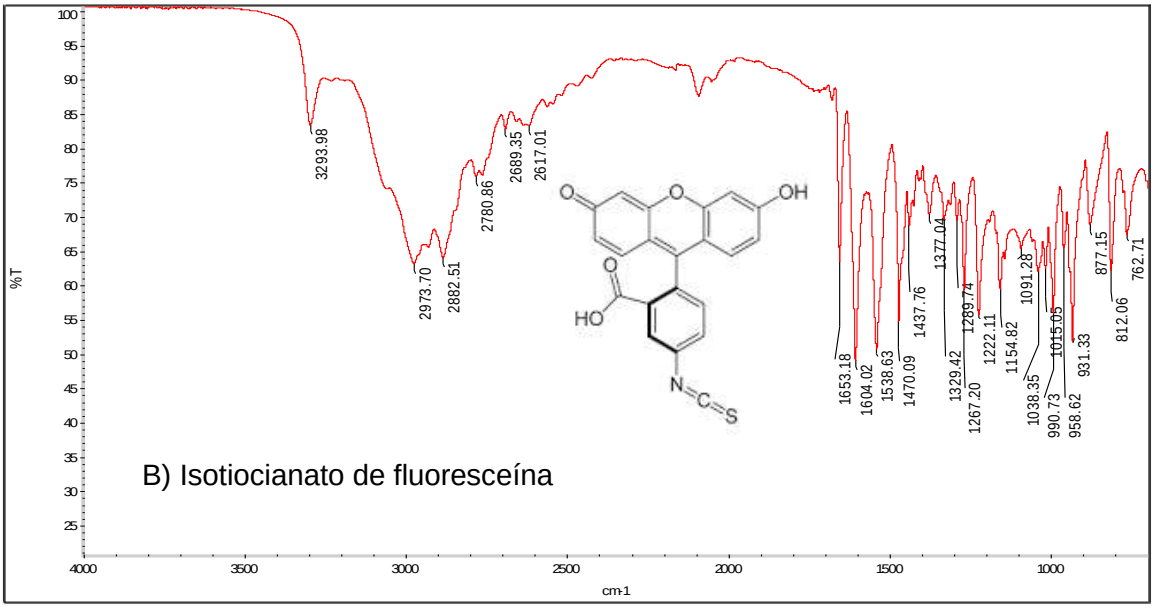


Imagen VII. Estructura de Metacrilato de fluoresceína.

IV.II. CARACTERIZACIÓN

En la caracterización del monómero se utilizó espectrofotometría infrarroja, en la imagen XII se muestran los espectros IR, A) Metacrilamida, B) Isotiocianato fluoresceína, C) Metacrilato de fluoresceína. Y en la imagen XIII se muestra la resonancia magnética nuclear del metacrilato de fluoresceína (FIMC).


A) Metacrilamida
%T
cm-1
2026.81
1644.46
1595.89
1578.39
1531.47
1485.25
1461.09
1386.20
1363.83
1315.58
1267.68
1245.29
1206.72
1172.30
1109.62
1084.00
980.01
961.77
911.17
854.94
823.95
802.80
760.88
726.00


B) Isotiocianato de fluoresceína
%T
cm-1
3293.98
2973.70
2882.51
2780.86
2689.35
2617.01
1653.18
1604.02
1538.63
1470.09
1437.76
1377.04
1329.42
1289.74
1267.20
1222.11
1154.82
1091.28
1038.35
1015.05
990.73
958.62
931.33
877.15
812.06
762.71

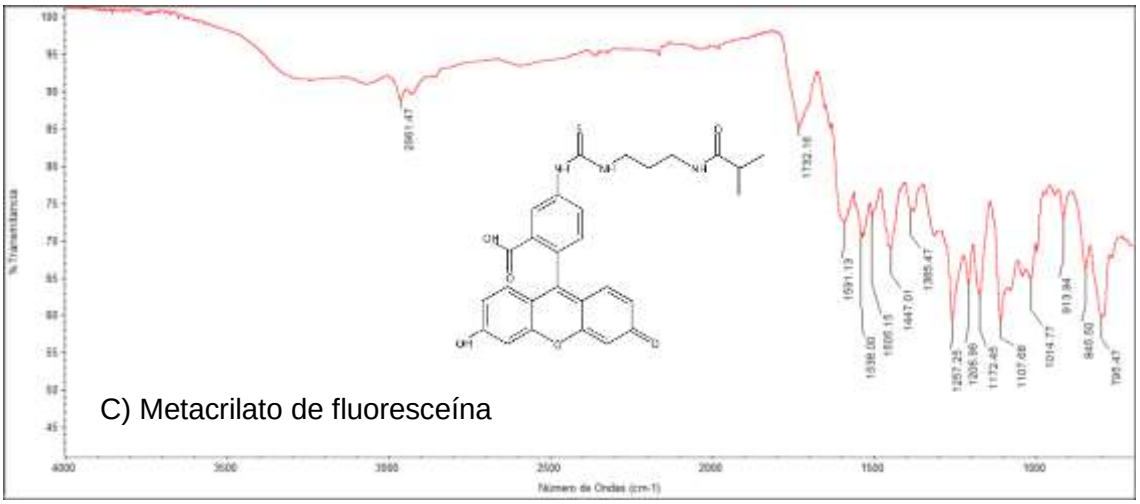


Imagen VIII. Espectros Infrarrojo. A) En el doble enlace C=O se encuentra entre las regiones 1630-1850 cm-1, y la amida NH_2 absorbe cerca de los 1500 cm-1, el metilo se encuentra entre las regiones de 1450-1375 cm-1, el metileno se encuentra en la región de 880 cm-1. B) el isotiocianato se encuentra entre las regiones 2125 cm-1, el ácido carboxílico se encuentra entre las regiones de 3500-2500 cm-1.

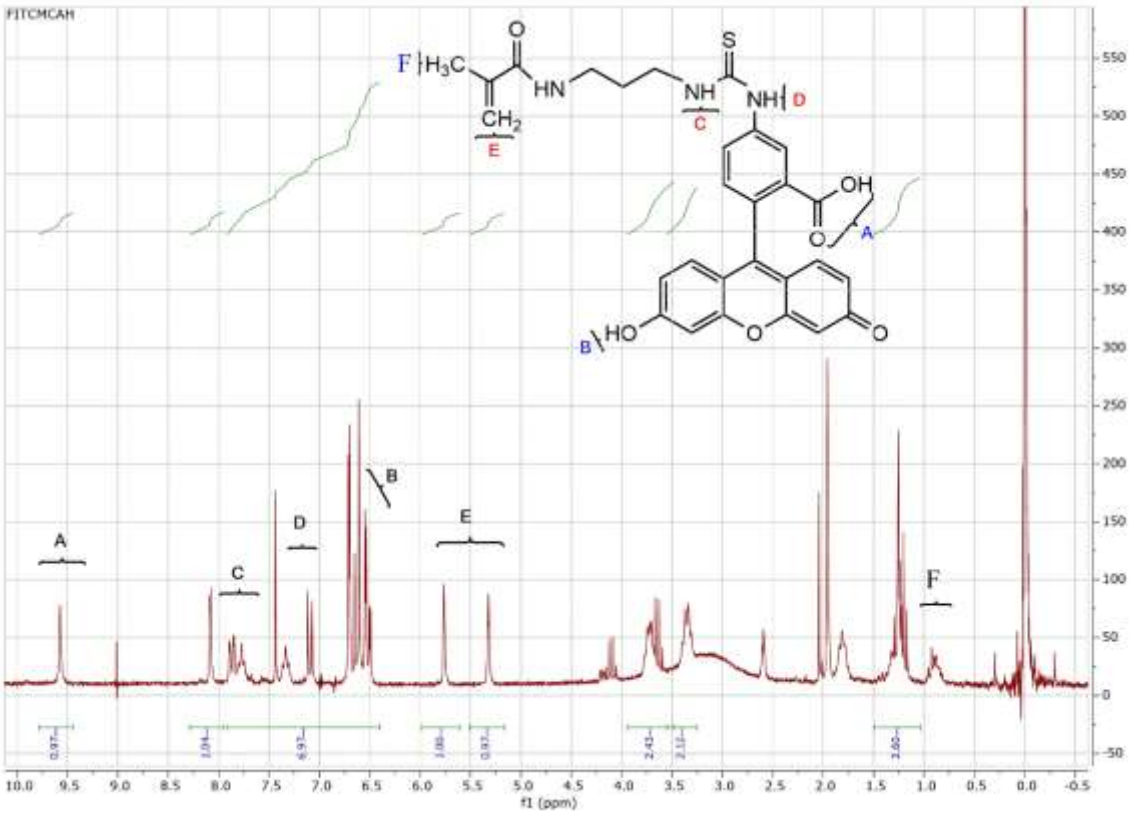


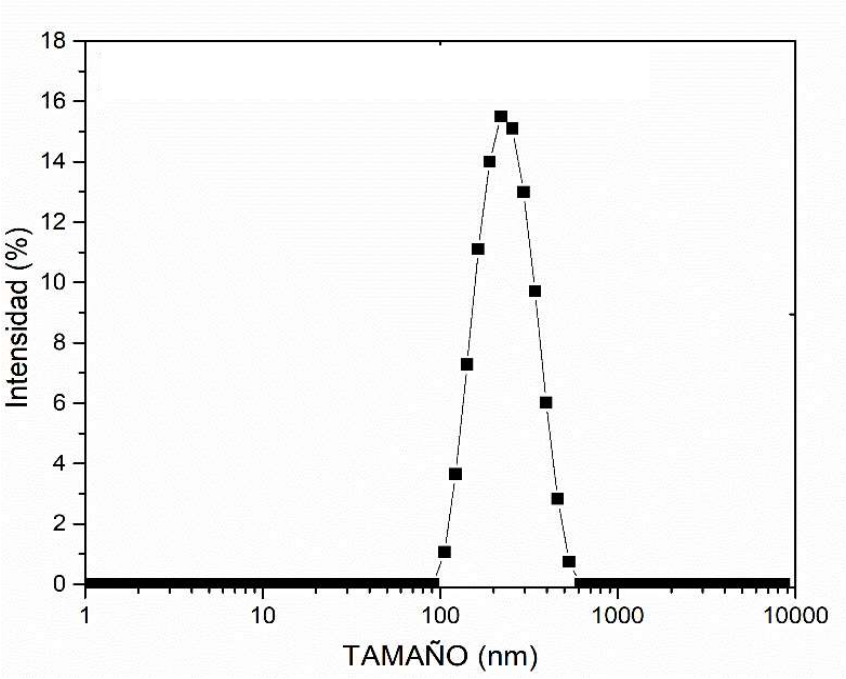
Imagen IX. Resonancia magnética nuclear (RMN), esta técnica nos permitió observar e identificar moléculas presentes atreves de las señales espectrales en el que se representa la localización de las principales moléculas de FIMC.

IV.III. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

IV.III.I Síntesis de nanogeles al de DEAEM/MCF 15:0.5 EGDMA/APS

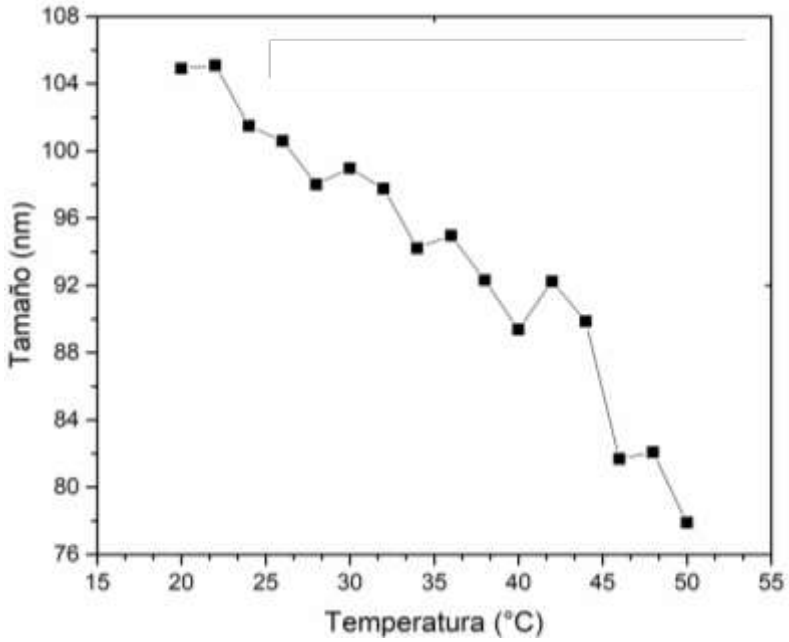
En el ensayo preliminar para el estudio de la formación de nanogeles, se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM y MCF al 0.5%,

entrecruzadas con EGDMA e iniciadas con APS, estas dispersiones se caracterizaron vía DLS a 25°C, para analizar el tamaño de partícula con el Dh, los resultados que se muestran en la gráfica I con una sola distribución, donde se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 197.9 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.123.



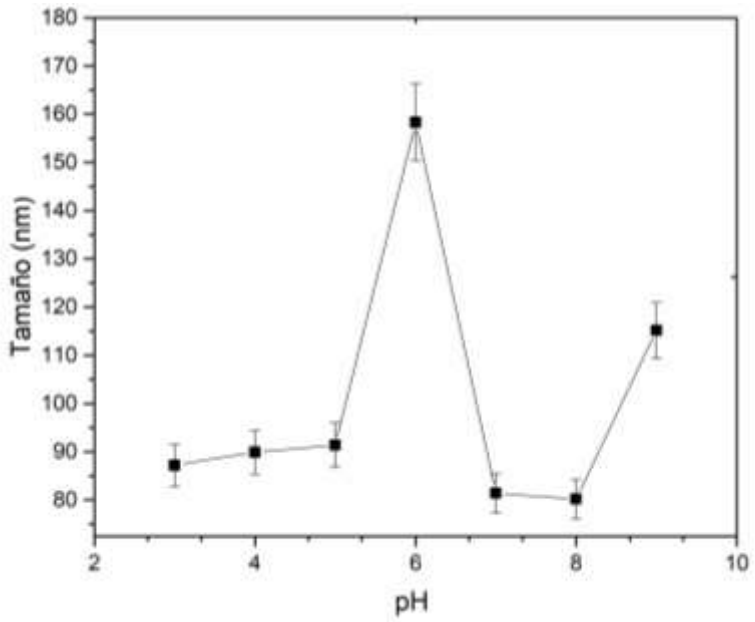
Grafica I. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ MCF $_{0.5\%mol}$

Se le realizó el análisis correspondiente de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica II donde se observó que las nanogeles sintetizadas por encima de los 37 °C las partículas comienzan a colapsar y por debajo de los 37 °C las partículas se aglomeran, se observa una disminución en el tamaño de partícula respecto a la temperatura.



Grafica II. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.5\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

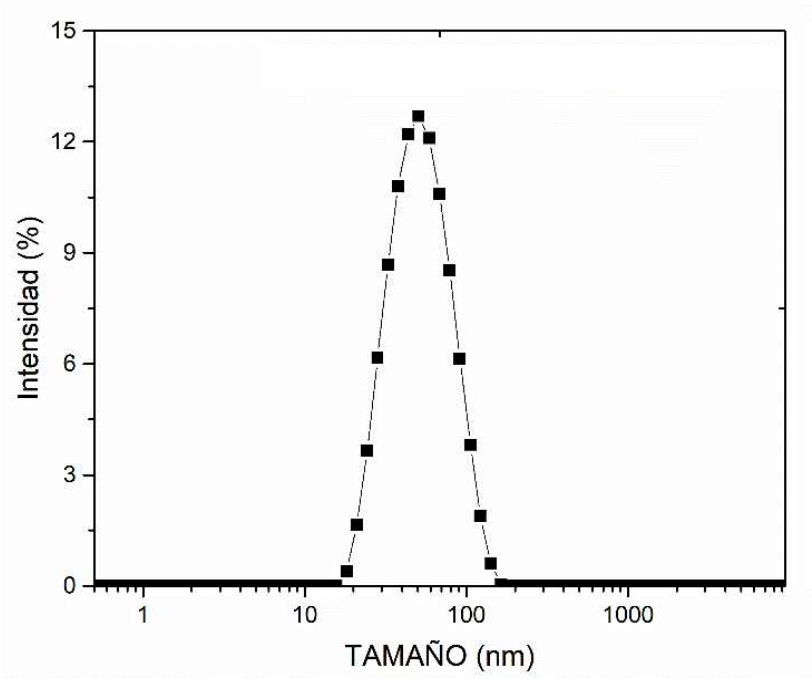
En la Gráfica III se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observaron tamaños de partícula entre 70 y 80 nm en pH ácidos, se observa aglomerado en pH 7 y un ligero colapso de las nanopartículas en pH alcalinos con un tamaño promedio de 110 a 145 nm el doble del tamaño comparados con pH ácidos esto puede deberse a una interacción entre los iones.



Grafica III. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.5\%mol}$.

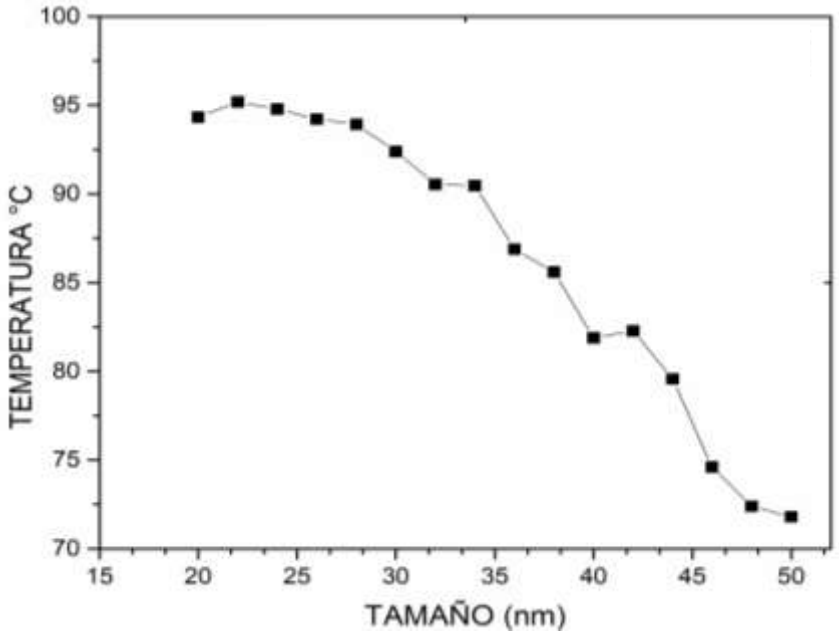
IV.III.II Síntesis de nanogeles al de DEAEM/MCF 15:0.3 APS/EGDMA

Se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM y MCF al 0.3%, iniciadas con APS y entrecruzadas con EGDMA, los resultados se muestran en la gráfica IV donde se midió el tamaña y su comportamiento a 25 °C, donde se obtuvo un promedio en el tamaño de partícula de 197.9 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.116.



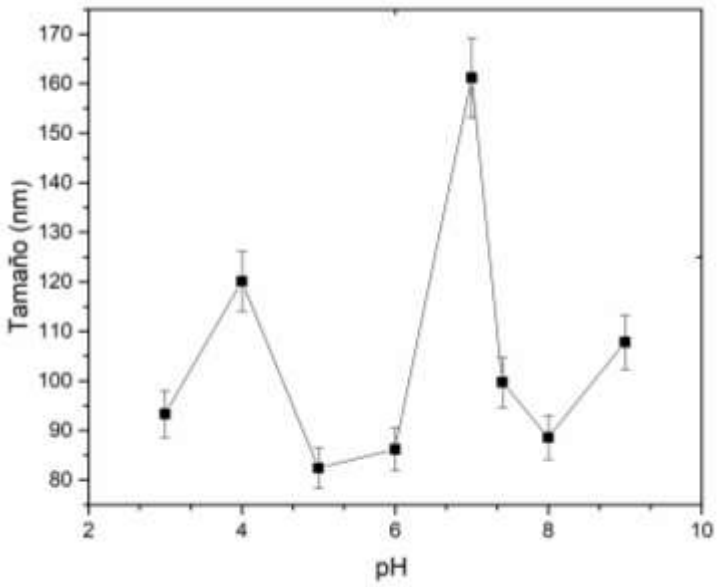
Grafica IV. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$

Se realizó un análisis de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica V donde se observó que las nanogeles sintetizadas por encima de los 37 °C las partículas comienzan a colapsar y por debajo de los 37 °C las partículas se aglomeran, comparada con la síntesis que contenía mayor porcentaje de MCF esta reacción tiene una mejor respuesta a el aumento de temperatura siguiendo un tendencia de colapso y disminución del tamaño mientras aumenta la temperara.



Grafica V. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

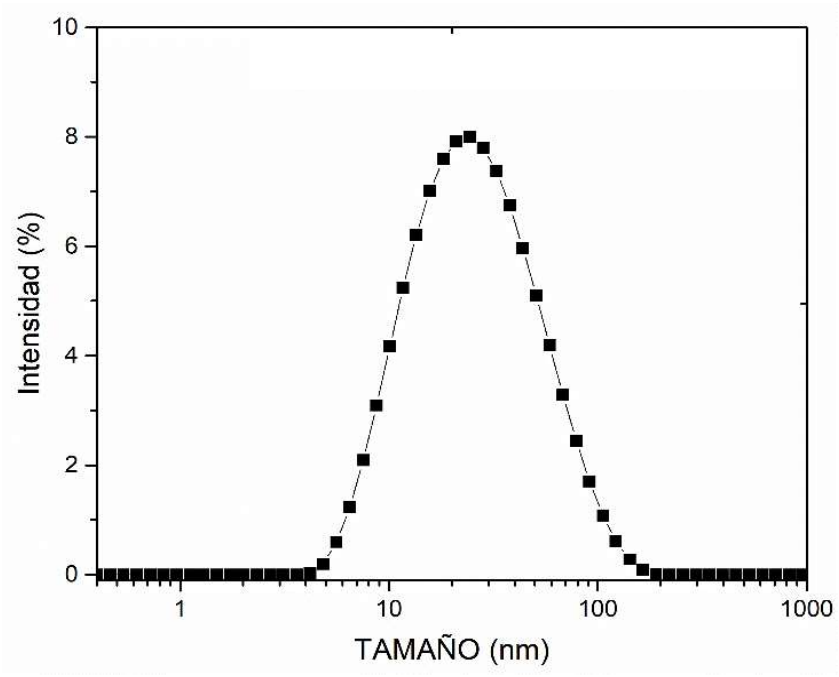
En la Gráfica VI se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observó que el tamaño de partícula es variado hay aglomeración y colapso de las partículas sin importar la acides o alcalinidad del medio, esto quizás se debe a la interacción de aminas o de los iones presentes de los nanogeles.



Grafica VI. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ MCF $_{0.3\%mol}$

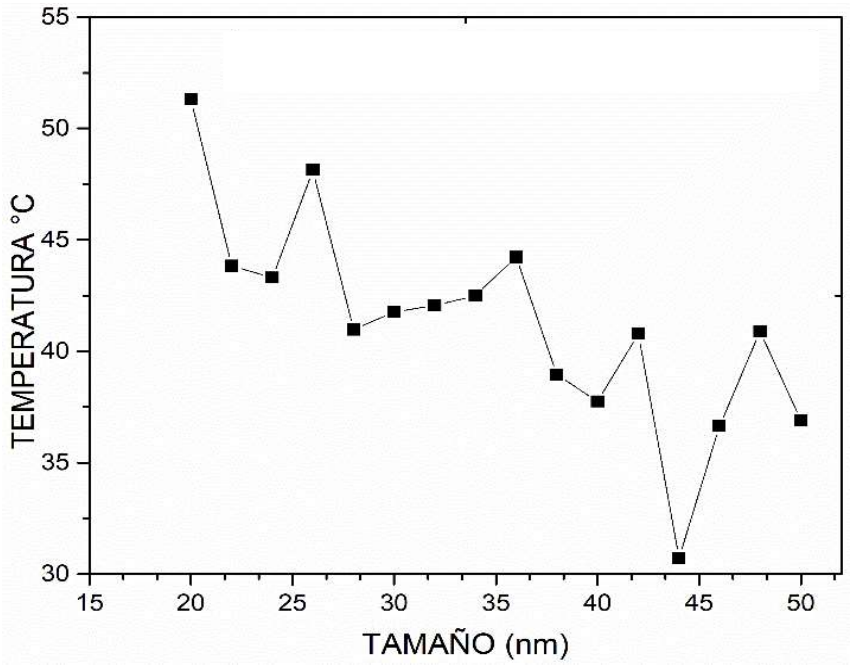
IV.III.III Síntesis de nanogeles al de DEAEM/MCF 15:0.3 DVA/APS

Se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM y MCF al 0.3%, entrecruzadas con DVA e iniciadas con APS, los resultados se muestran en la gráfica VII donde se midió el tamaña y su comportamiento a 25 °C, donde se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 43.3 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.282.



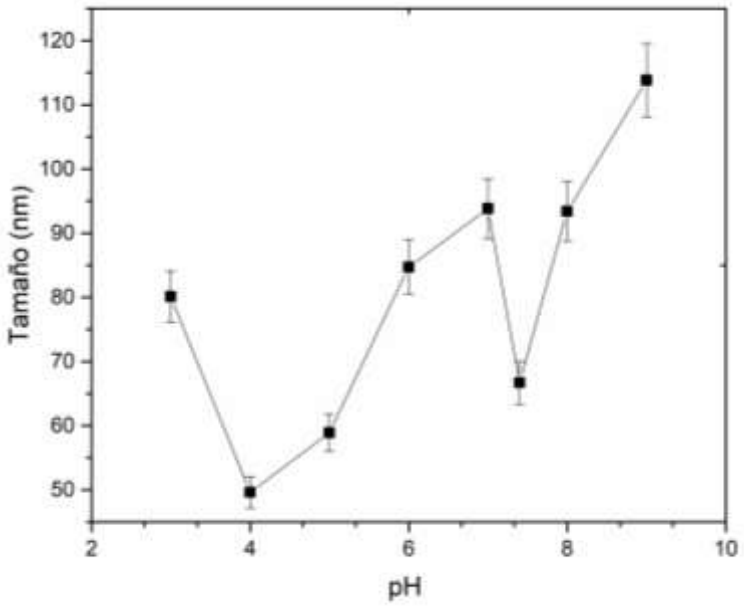
Grafica VII. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC 0$_{.3\%mol}$

Se le realizó un análisis de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica VIII donde se observó que las nanogeles no siguen una tendencia normal de colapso comparándolo con otras síntesis, hay variación en el tamaño de las partículas, pero se ve claramente un colapso y una disminución en su tamaño hidrodinámico.



Grafica VIII. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

En la Gráfica IX se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observó que el tamaño de partícula es variado aumenta con forme el pH es más alcalino, pero se observó que a pH 7.4 hay un ligero colapso en el tamaño.



Grafica IX. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{15\%mol}$ FIMC $_{0.3\%mol}$

IV.IV. Potencial Zeta

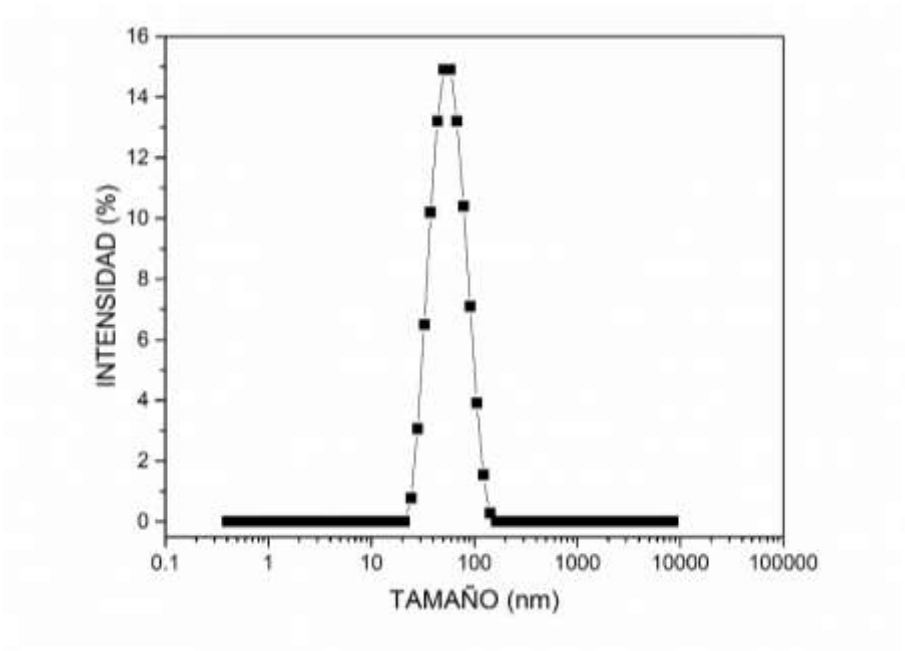
Los resultados de potencial Zeta realizados a las diferentes síntesis de nanogeles se muestran en la tabla 1 (n=6). Se esperaba que el potencial Zeta de las síntesis iniciadas con APS fueran positivos, esto probablemente el pH final de las síntesis tenía un pH promedio entre 5.6 y 5.8, y es necesario que la síntesis tenga un pH igual o superior a 6 para obtener un potencial Zeta positivo en las síntesis con iniciados catiónico.

Tabla II. Potencial Zeta.

Nombre de la síntesis (n=6)	***mV***	***pH- síntesis en agua***
EG-AP15% FITC 0.5%	-10.15	5.6
EG-APS 15% FITC 0.3%	-6.47	5.7
DVA-APS 15% FITC 0.5%	-10.38	5.6

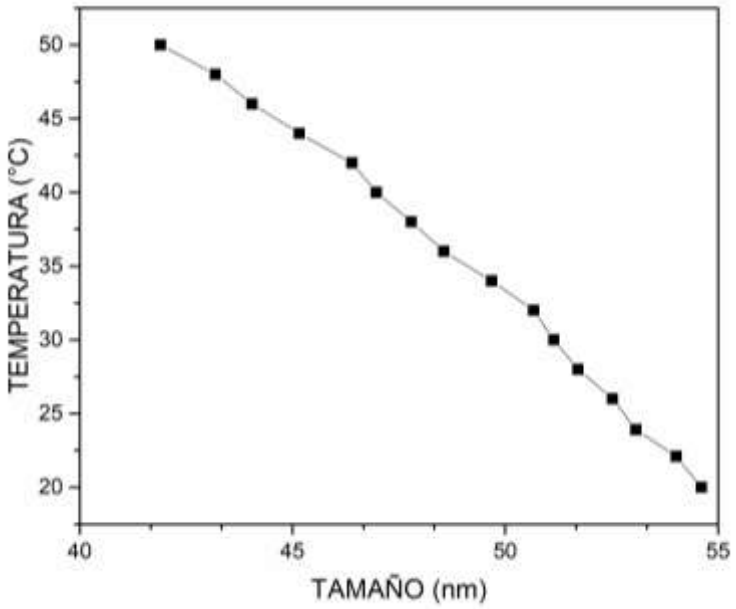
IV.V. Síntesis de nanogeles al de DEAEM 5% DVA/APS

Se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM al 5% iniciadas con APS y entrecruzadas con DVA, los resultados se muestran en la gráfica X donde se midió el tamaña y su comportamiento a 25 °C, donde al 5% se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 53 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.146.



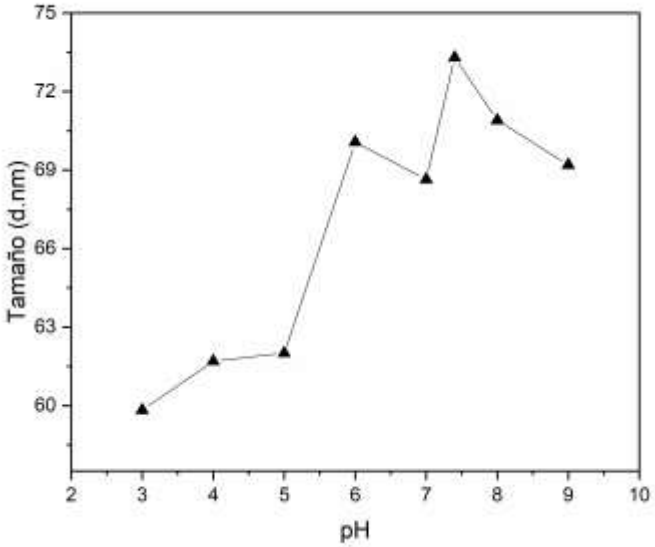
Grafica X. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM5%mol

Se le realizó un análisis de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica XI donde se observó que las nanogeles siguen una tendencia normal de colapso esto nos indica que su diámetro hidrodinámico está disminuyendo y aumentando la dispersión.



Grafica XI. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM$_{5\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

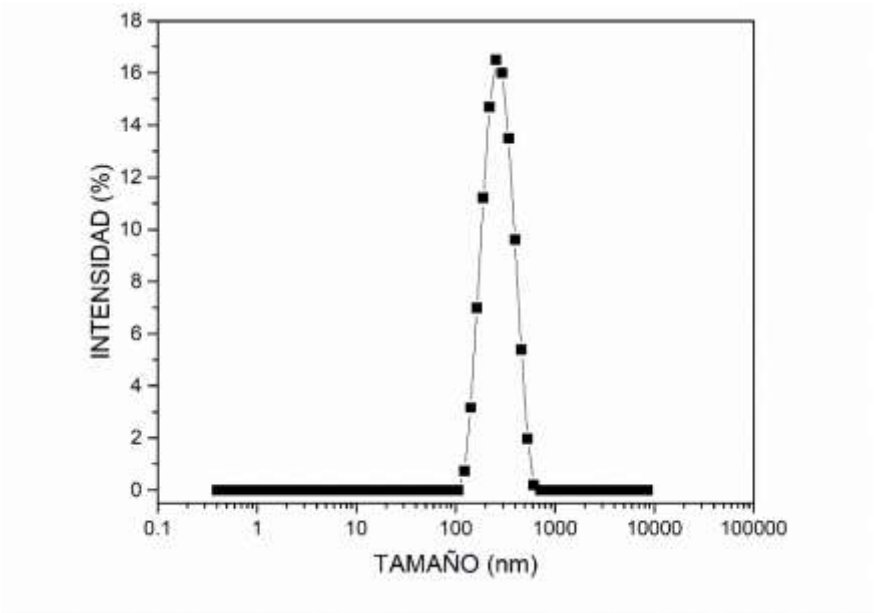
En la gráfica XII se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observó que el tamaño de partícula aumenta ligeramente con respecto al evaluado en condiciones normales, con forme el pH es más básico se observa un aumento gradual en el tamaño de partícula, pero se observó que a pH 7.4 hay un ligero colapso en el tamaño.



Grafica XII. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{5\%}$

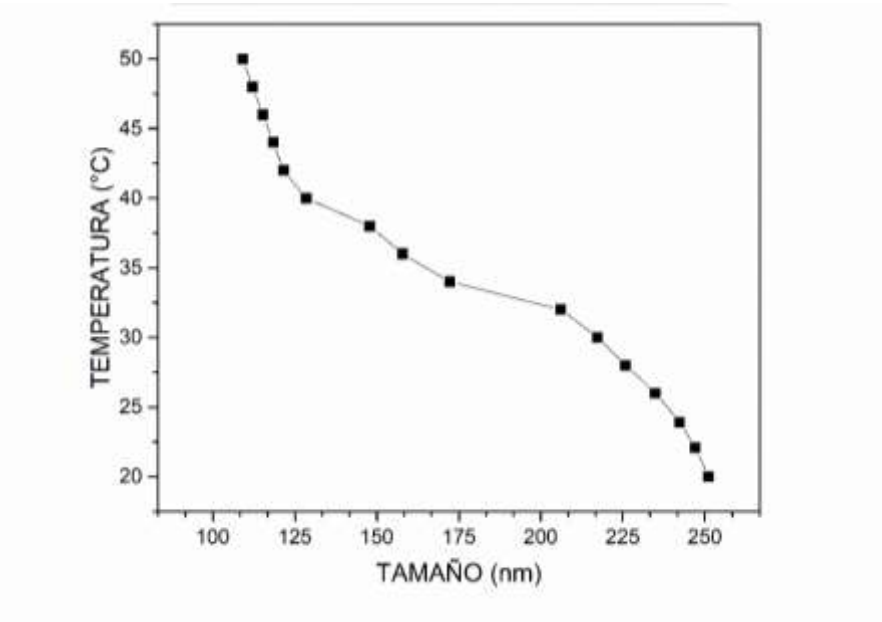
IV.VI Síntesis de nanogeles al de DEAEM 5% EGDMA/APS

Se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM al 5% iniciadas con APS y entrecruzadas con EGDMA, los resultados se muestran en la gráfica XIII donde se midió el tamaña y su comportamiento a 25 °C, donde al 5% se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 229 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.202.



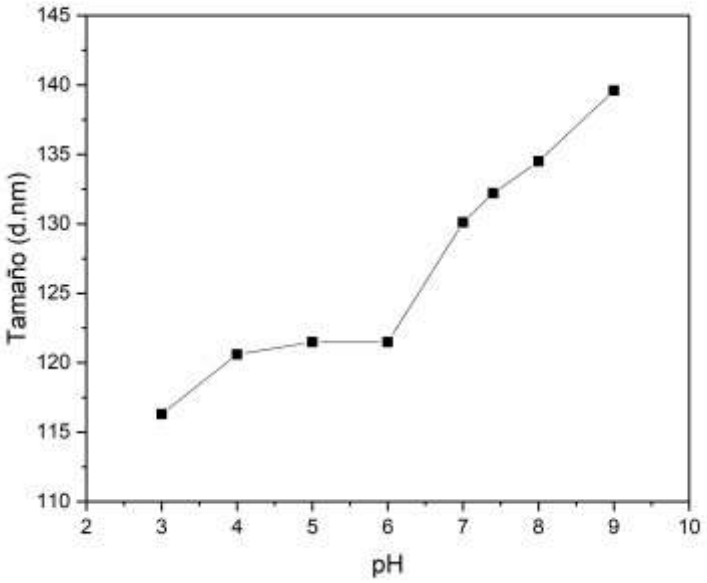
Grafica XIII. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{5\%mol}$

Se le realizó un análisis de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica XIV donde se observó que las nanogeles siguen una tendencia colapso conforme aumenta la temperatura esto nos indica que su diámetro hidrodinámico está disminuyendo.



Grafica XIV. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{5\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

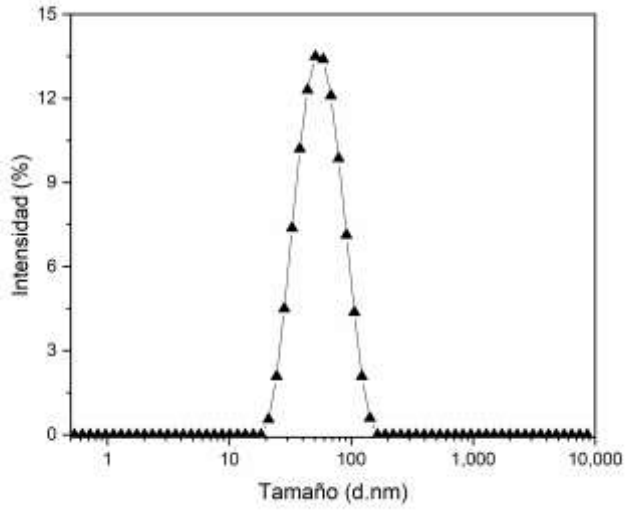
En la gráfica XV se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observó que el tamaño de partícula aumenta ligeramente con respecto al evaluado en condiciones normales, con forme el pH es más básico se observa un aumento gradual en el tamaño de partícula, pero se observó que a pH 7.4 hay un ligero colapso en el tamaño.



Grafica XV. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM5%

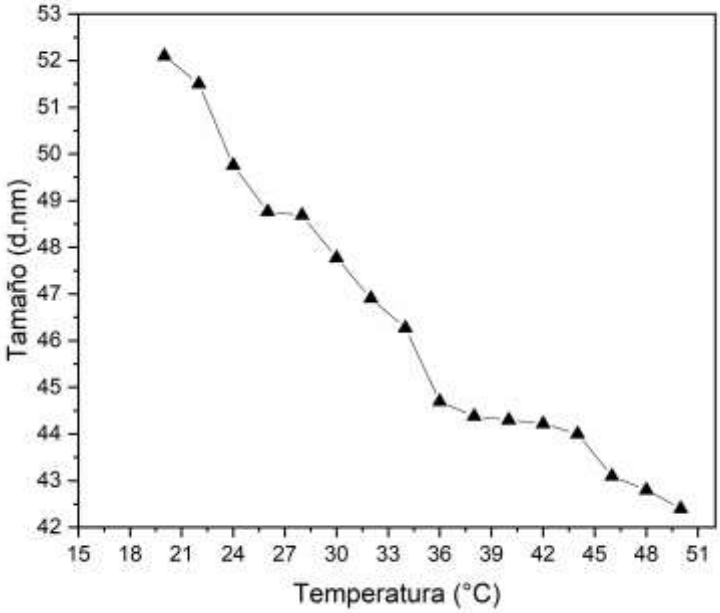
IV.VII Síntesis de nanogeles al de DEAEM 10% DVA/APS

Se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM al 10% iniciadas con APS y entrecruzadas con DVA, los resultados se muestran en la gráfica XVI donde se midió el tamaña y su comportamiento a 25 °C, se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 51 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.14.



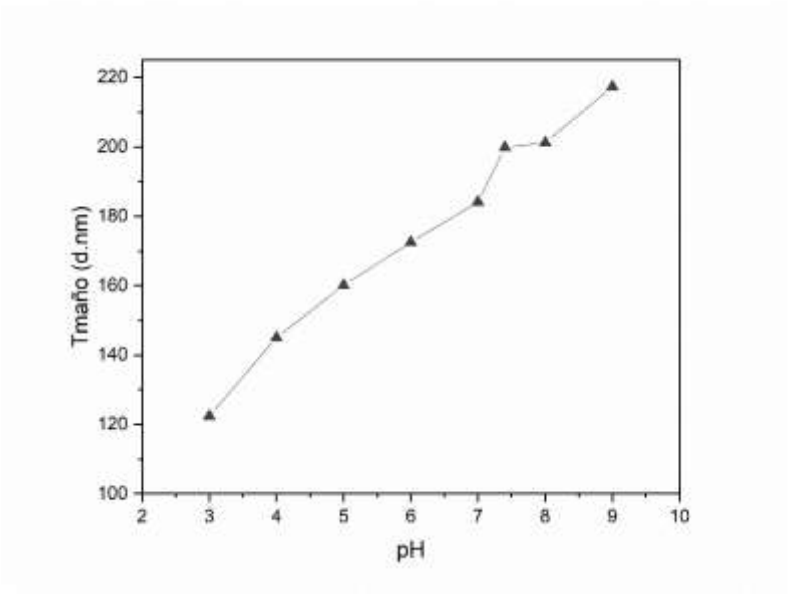
Grafica XVI. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM$_{10\%mol}$

Se le realizó un análisis de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica XVII donde se observó que las nanogeles siguen una tendencia normal de colapso esto nos indica que su diámetro hidrodinámico está disminuyendo y aumentando la dispersión, su temperatura de transición se encuentra en aproximadamente 33 °C correspondiente a la temperatura ya registrada de NIPAAm.



Grafica XVII. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/DEAEM$_{10\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

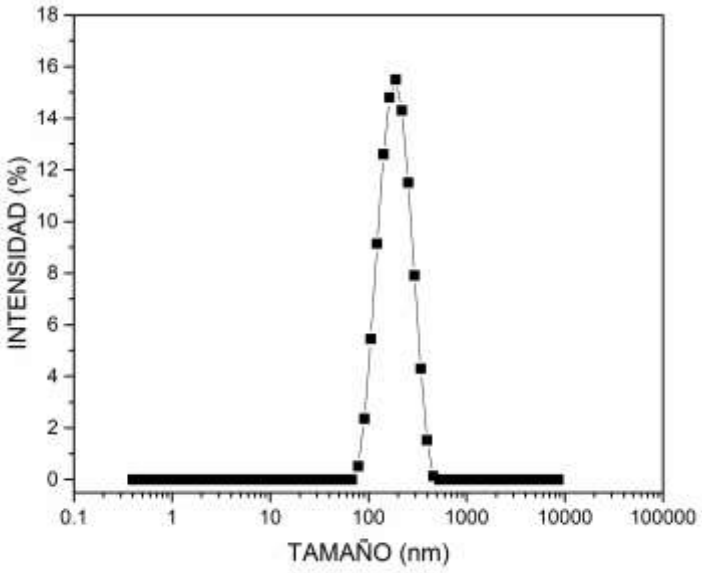
En la gráfica XVII se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observó que el tamaño de partícula aumenta exponencialmente con respecto al evaluado en condiciones normales, esto podría deberse a la interacción iónica del DEAEM.



Grafica XVIII. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/APS/DEAEM$_{10\%}$

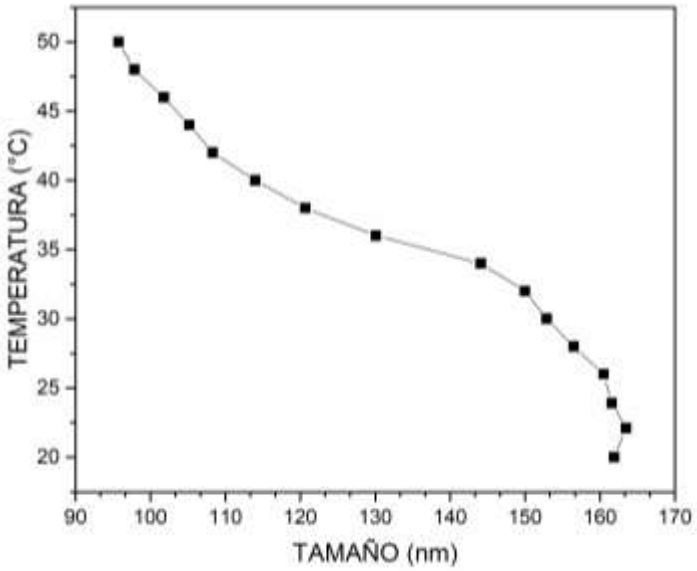
IV.VIII Síntesis de nanogeles al de DEAEM 10% EGDMA/APS

Se realizó la síntesis de nanogeles copolimerizado con DEAMEM al 10% iniciadas con APS y entrecruzadas con EGDMA, los resultados se muestran en la gráfica XX donde se midió el tamaña y su comportamiento a 25 °C, donde al 10% se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 161 nm y un índice de poli dispersión (PDI) de 0.194.



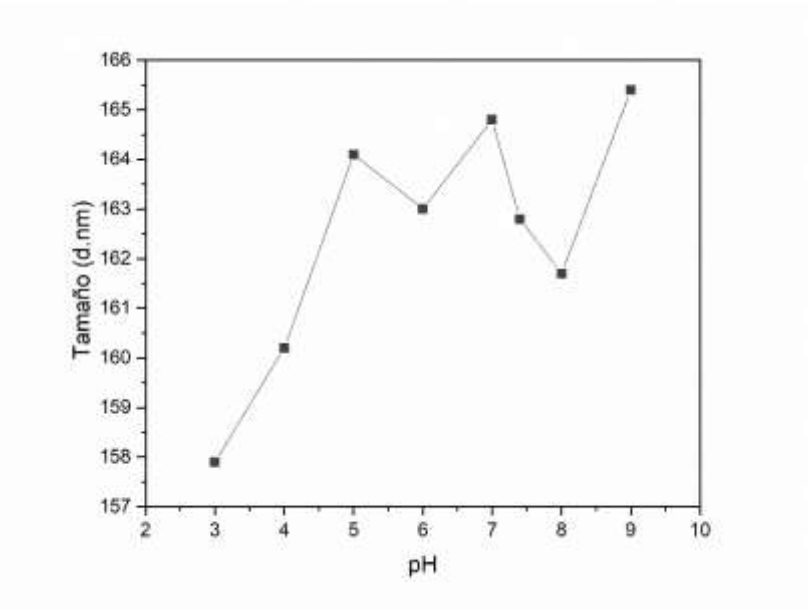
Grafica XIX. Distribución de tamaños por volumen a 25ºC de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{10\%mol}$

Se le realizó un análisis de tendencia a temperaturas de 20 °C a 50 °C donde se observó el comportamiento en el tamaño de partícula con respecto a la temperatura, los resultados se muestran en la gráfica XXI donde se observó que las nanogeles siguen una tendencia colapso conforme aumenta la temperatura esto nos indica que su diámetro hidrodinámico está disminuyendo.



Grafica XX. Efecto de la temperatura de transición en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/DEAEM$_{10\%mol}$ en un barrido de temperaturas.

En la gráfica XXII se muestra los resultados obtenidos de las nanopartículas y su respuesta a distintos pH en condiciones de temperatura de 25 °C, donde se observan cambios en el tamaño de partícula, en pH ácidos el tamaño es más pequeño, comparado con los pH básico, pero observamos un ligero colapso en pH 7.4 y 8 que se considera normal.



Grafica XXI. Efecto del pH a 25°C en el tamaño de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/APS/DEAEM$_{10\%}$

IV.IX. CARGADO DE NANOPARTICULAS

Los experimentos para incorporar los fármacos modelos a los nanogeles, NIPAAm/EGDMA/DEAEM$_{5\%mol}$, NIPAAm/DVA/DEAEM$_{5\%mol}$ y NIPAAm/EGDMA/DEAEM$_{10\%mol}$, se realizaron utilizando dos metodologías, pero en mismas condiciones de temperatura de equilibrio, temperatura de recuperación. Para cuantificar la cantidad de fármaco cargado, con los cuales se obtiene el porcentaje de carga y la eficiencia.

IV.X CARGADO DE NANOGELES CON INDOMETACINA

Los experimentos de cargado con indometacina se realizaron en mismas condiciones de temperatura, pero variando el medio de liberación. En la tabla II se muestran los resultados obtenidos de acuerdo con los cálculos utilizados

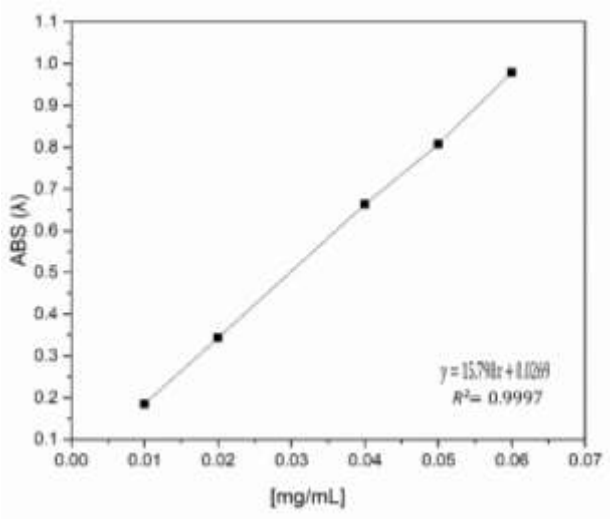
Tabla III. % de cargado y en nanogeles cargados con Indometacina

Nanogeles	***% de cargado***	***% Rendimiento***
NIPAAm/EGDMA/DEAEM$_{5\%mol}$	**6.59**	**57.14%**
NIPAAm/DVA/DEAEM$_{5\%mol}$	**4.15**	**41.06%**
NIPAAm/EGDMA/DEAEM$_{10\%mol}$	**7.19**	**44.5%**
NIPAAm/DVA/DEAEM$_{10\%mol}$	**5.23**	**44.06%**

Las condiciones para estos experimentos fueron iguales para cada composición de nanogeles. Para las cuatro formulaciones de nanogeles el medio de equilibrio fue agua a 20°C. Con los resultados obtenidos, se puede observar que los nanogeles entrecruzados con EGDMA$_{5\%mol}$ obtienen mayor eficiencia y mayor % de carga comparados con los nanogeles entrecruzados con EGDMA$_{10\%mol}$ y DVA$_{5\%mol}$; se esperaría que los nanogeles entrecruzados con DVA tuvieran mayor % de carga ya que estos nanogeles son de menor Dh y poseen mayor área superficial para adherirse.

IV.X.I. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA INDOMETACINA

Las curvas de calibración de indometacina fueron lineales con coeficientes de correlación iguales a 0.9997. Utilizando los datos del área bajo la curva de cada una de las concentraciones.



[mg/mL]	ABS (Λ)
0.01	0.185
0.02	0.343
0.04	0.663
0.05	0.807
0.06	0.98

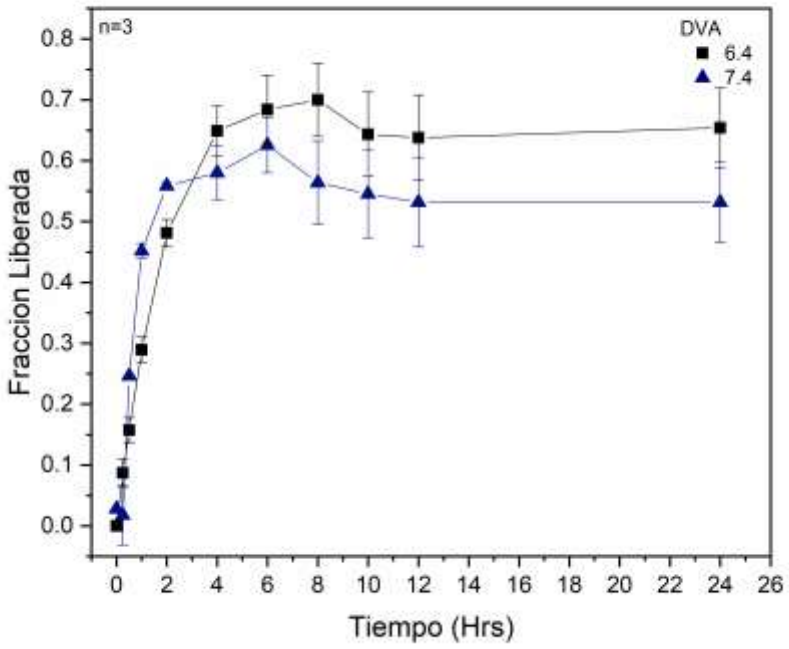
Grafica XXII. Curva de calibración de indometacina.

IV.X.II. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Los experimentos para la liberación controlada de los fármacos modelos incorporados a los nanogeles, se realizaron variando condiciones, tales como la naturaleza del medio de liberación y manteniendo la temperatura, con la finalidad de analizar la aplicación de los nanogel en la liberación controlada de los fármacos en condiciones fisiológicas normales.

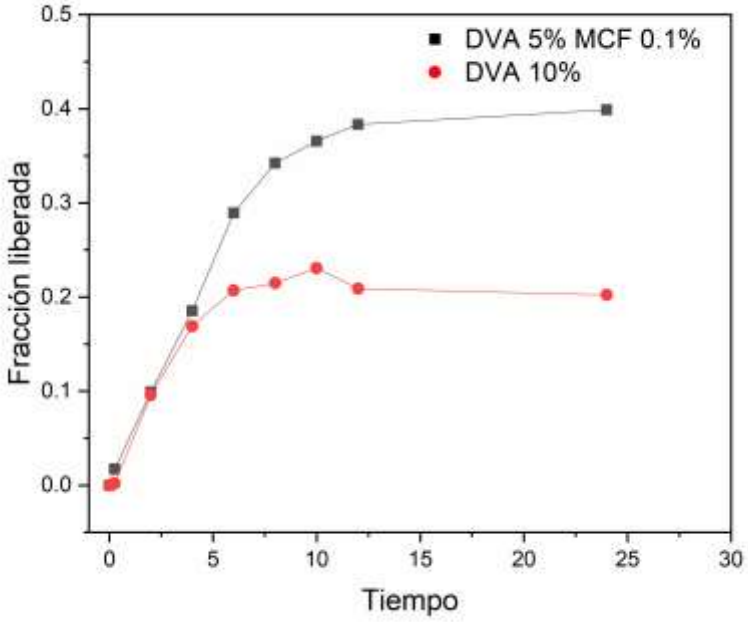
IV.X.III ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE NANOGELES CARGADOS CON INDOMETACINA.

Para cuantificar la cantidad de fármaco liberado, con respecto a la absorbancia, se utilizó la curva de calibración mostrada anteriormente y se obtuvo la fracción liberada con respecto al tiempo con los cálculos correspondientes. Las liberaciones con indometacina se realizaron a temperatura y pH determinados; en siguiente gráfica se observa la liberación con nanogeles DVA5%mol en la cual se observa liberación del fármaco con forme al tiempo , a las 4 horas hay una mayor fracción liberada a 37°C a pH 6.4 que a pH 7.4, posteriormente se mantiene la liberación durante 4 hora y a las 10 horas se observa una ligera caída de la absorbancia lo cual nos indica que se ha logrado liberar la mayor concentración de fármaco las 10 horas para la liberación a pH 6.4, comparada con la de 7.4 que su liberación máxima es a la 6 horas.



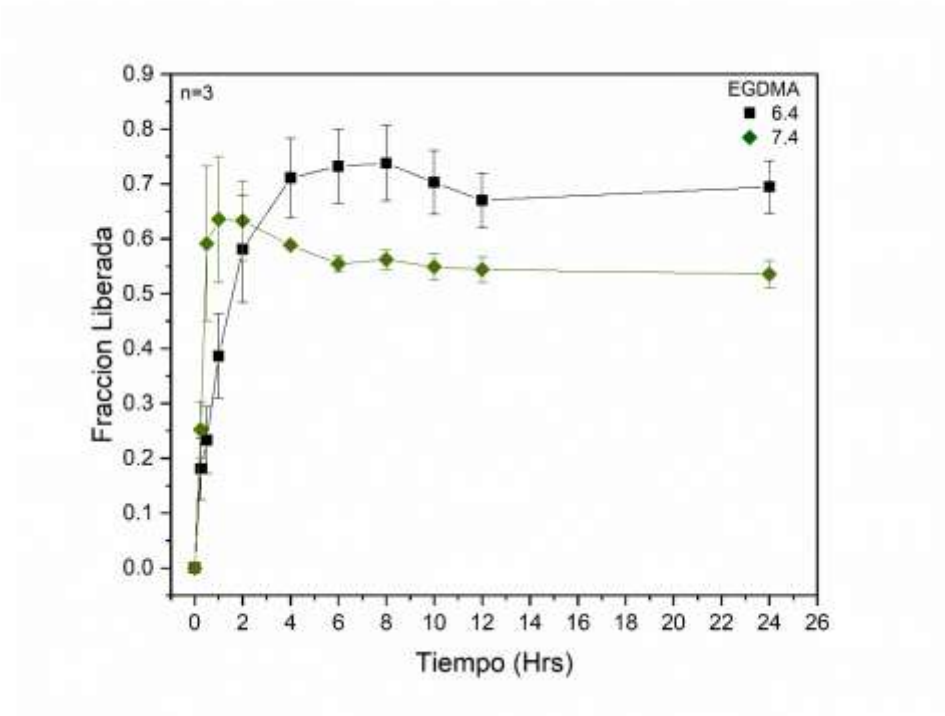
Grafica XXIII. Liberación del Indometacina a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA$_{5\%mol}$ a 37°C y pH 7.4 y 6.4

En la gráfica siguiente se observa la liberación con nanogeles DVA$_{10\%mol}$ y DVA$_{5\%mol}$/MCF$_{0.1\%mol}$ en la cual se observa una mayor deficiencia en la liberación de los nanogeles DVA$_{10\%mol}$, a las 4 horas hay una mayor fracción liberada a 37°C a pH 7.4, posteriormente hay una ligera caída en la absorbancia, aproximada a las 6 h, en los nanogeles copolimerizado DVA$_{5\%mol}$/MCF$_{0.1\%mol}$ se observó una mayor liberación del fármaco conforme transcurre el tiempo se observa una mayor fracción libre del fármaco sin observarse caída en la absorbancia.



Gráfica XXIV. Liberación de indometacina a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA$_{10\%mol}$ y NIPAAm/PEGMAM/DVA$_{10}$DVA$_{5\%mol}$/MCF$_{0.1\%mol}$, a 37°C y pH 7.4

En la Gráfica siguiente se observa la liberación con nanogeles EGDMA$_{5\%mol}$ en la cual se observa una mayor deficiencia en la liberación de los nanogeles a las 2 horas se ha liberado la mayor cantidad de fármaco a 37°C y pH 7.4 comparada con liberación a pH 6.8, donde es a las 4 horas la mayor cantidad de fármaco liberada y pareciera observarse una liberación sostenida ya que durante 6 horas posteriores se mantiene la concentración de fármaco libre hasta las 12 horas que comienza a disminuir, resultados contrarios en la liberación a pH 7.4 donde después de las 2 horas ya no hay liberación de fármaco.

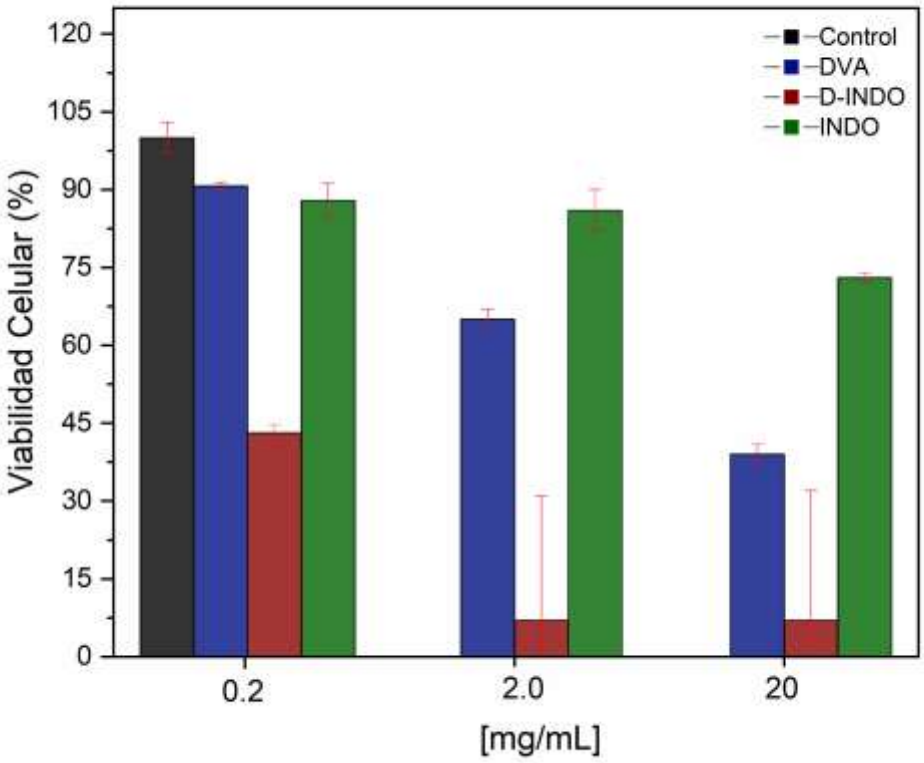


Grafica XXV. Liberación del Indometacina a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/ $EGDMA_{5\%mol}$, a 37°C y pH 7.4 y 6.4

IV.XI. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

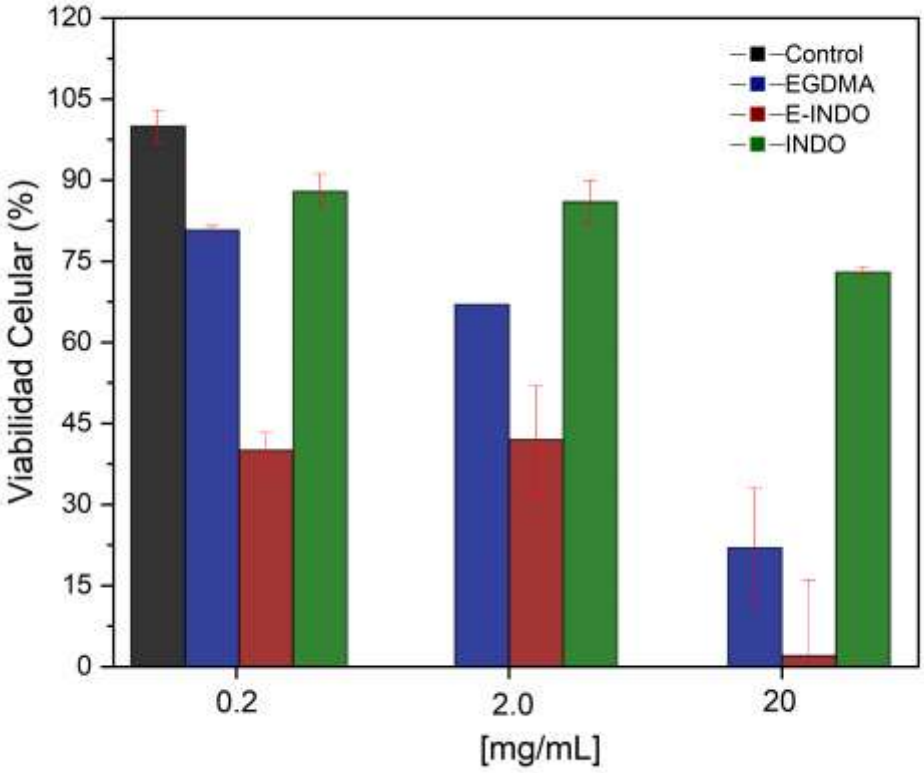
En este estudio, se investigó la citotoxicidad de nanogeles sin carga y cargados con indometacina en la línea celular de fibroblastos 3t3 durante 24 horas usando el método MTT.

En la gráfica XXVVII siguiente se muestran nanogeles entrecruzados con DVA y cargados con indometacina, los cuales observamos que tienden a disminuir la viabilidad celular hasta un 85% a concentraciones altas, pero no es así como los nanogeles sin carga que la viabilidad disminuye un 40% en promedio.



Grafica XXVI. Pruebas de viabilidad celular en células 3t3 de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA y nanogeles cargados con indometacina

En la gráfica XXVIII siguiente se muestran nanogeles entrecruzados con EGDMA y cargados con Indometacina los cuales observamos que tienden a disminuir la viabilidad celular de casi del 100% a concentraciones altas, a bajas concentraciones se observa una disminución aproximadamente del 60% en la viabilidad, observando los nanogeles sin fármaco se obtuvieron resultados en la diminución de la vialidad de un 25% en promedio a bajas concentración, no siendo de la misma manera para concentraciones altas donde disminuye aproximadamente un 70%.

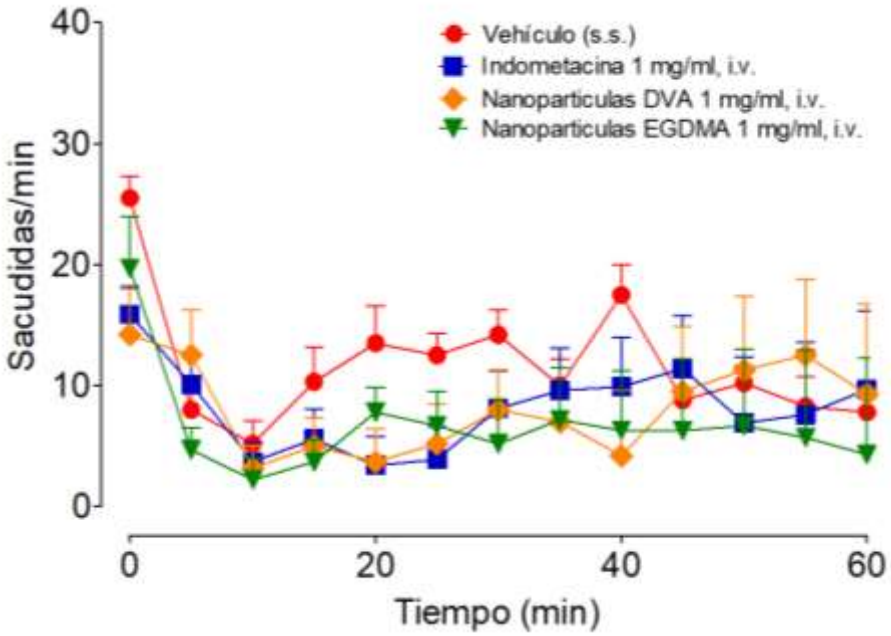


Grafica XXVII. Pruebas de viabilidad celular en células 3t3 de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM a dos concentraciones de $EGDMA_{10\%mol/5\%mol}$ y a NIPAAm/PEGMAM/ $EGDMA_{15\%mol}/MCF_{0.5\%mol}$

IV.XII. ANALIZAR EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS NANOGELES CARGADOS CON INDOMETACINA EN RATAS WISTAR CON EL MODELO DE LA INFLAMACIÓN Y EL DOLOR

IV.XII.I. Efecto de la formalina como agente nociceptivo

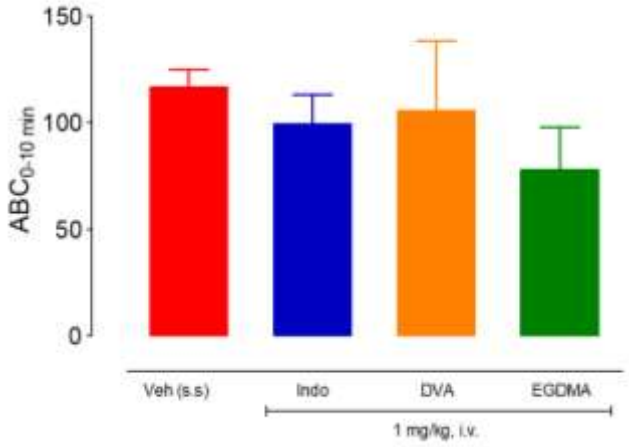
El estudio se realizó en ratas Wistar, todas en las condiciones similares de edad, peso promedio de 174 y 220g y temperatura constante de 22°C. Se siguieron todos los protocolos éticos señalados por el comité de ética. El efecto nociceptivo fue inducido por una inyección de formalina intraplantar en la pata derecha 45 minutos después de la aplicación de las soluciones aplicadas vía intravenosa. En la Gráfica XXX se muestran los promedios de los conteos de las sacudidas de las patas de las ratas desde tiempo 0-60 minutos cada 5 minutos. Donde no hay diferencia estadísticamente significativa entre una formulación y otra en los primeros 10 minutos, pero podemos observar que a los 15 minutos hay una diferencia en las sacudidas, teniendo más efecto en la disminución del efecto nociceptivo las nanopartículas de DVA que las de EGDMA comparadas con el vehículo, siendo similar el efecto comparándolas con la indometacina libre.



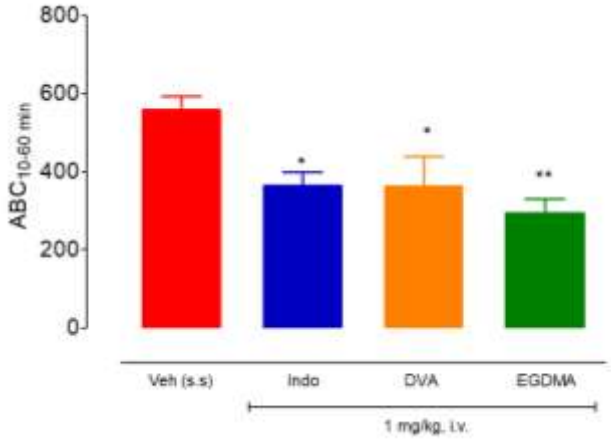
Grafica XXVIII. Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de formalina, utilizando nanopartículas de EGDMA Y DVA cargadas con indometacina.

La inyección intraplantar de formalina produce una respuesta dolorosa bifásica, la cual se compone de una fase temprana (primera fase), durante los primeros cinco minutos tras la inyección de la formalina, y una segunda fase tardía que comienza a los 10-15 minutos de la inyección y dura de 30 a 50 minutos. Tradicionalmente se ha considerado que la primera fase se debe a la activación directa de los nociceptores periféricos, y que la segunda es consecuencia de una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal (sensibilización central). Por lo tanto, el modelo de la formalina se usa normalmente como un modelo de dolor agudo y tónico. En la gráfica XXXI tenemos los resultados obtenidos comparando los resultados de las dos fases, donde como resultados podemos observar que en la primera fase tras la administración de formalina se ha propuesto que se debe a la activación directa de los nociceptores de las neuronas

en ese sentido la inyección de formalina produce una activación hasta los 10 minutos después de su aplicación. La segunda fase de dolor parece ser dependiente de la combinación de una reacción inflamatoria del tejido periférico y de cambios funcionales en las neuronas de la asta dorsal de la médula espinal. Se ha comprobado que las respuestas conductuales son inhibidas por la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). En ese sentido podemos ver una mayor respuesta en la disminución del dolor de las nanopartículas cargadas de EGDMA comparas con el vehículo y que son estadísticamente significativas.



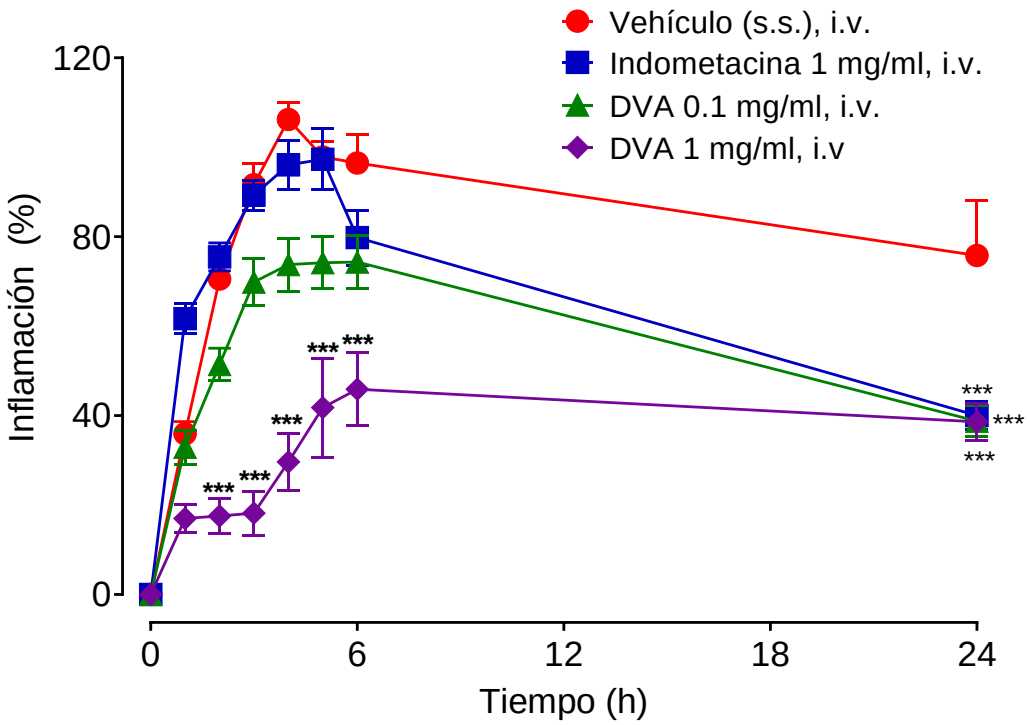
Grafica XXX. Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de formalina, Fase I.



Gráfica XXXI. Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de formalina, Fase II

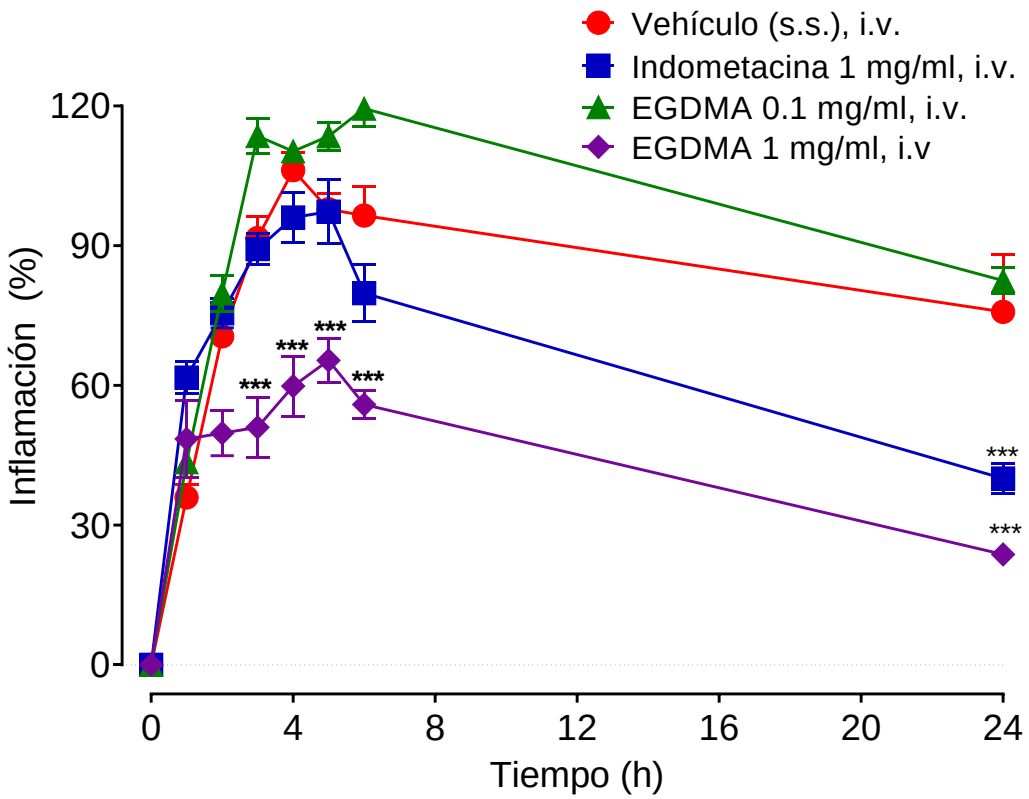
IV.XII. II.

La respuesta inflamatoria aguda se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular y la infiltración celular que conduce a la formación de edema, como resultado de la extravasación de líquidos y proteínas y la acumulación de leucocitos en el sitio inflamatorio. La carragenina es un polisacárido, lo que desencadena una respuesta inmune mediada por tirosina en los receptores TLRs (Toll-Like receptors) desencadenando la inflamación en la patita de la rata. En la Graficas XXXII corresponden a estudios realizados de nanogeles de DVA/INDO y la Gráfica XXXIII corresponden a estudios realizados de nanogeles de EGDMA/INDO en concentraciones de 1mg/ml y 0.1 mg/ml para ambas formulaciones, los ratones responden con un patrón inflamatorio constante a la carragenina, mostrando un edema bifásico que se desarrolla en las primeras horas, seguido de una segunda fase que comienza a las 6 h. Por lo tanto, el hallazgo encontrado, después de la inyección subplantar de carragenina, hubo un edema evidente. Se observa en los resultados de las dos formulaciones donde se utilizaron nanogeles hay una mayor disminución en la inflamación comparado con el control indometacina libre, EGDMA y DVA a concentración de 1 mg/mL disminuye la inflamación de la patita entre un 60 % y 40% y DVA a concentración de 0.1 mg/mL disminuyendo un 30% la inflamación también se observa de EGDMA a la misma concentración no tiene un efecto en la disminución de la inflamación de la patita de la rata, todo esto en relación al control que solo disminuye un 20% aproximadamente la inflamación. Debe tenerse en cuenta que la distribución de enzimas y la aparición de mediadores pueden cambiar constantemente.



Grafica XXXII. Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de Carragenina, de nanogeles de DVA/IndO.

*** p< 0.001, ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni



Grafica XXXIII. . Evaluación del efecto inflamatorio con la prueba de Carragenina, de nanogeles de EGDMA/IndO.

*** p< 0.001, ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni

CAPITULO V.

CONCLUCIONES

CONCLUSION 1

Se obtuvieron nanogeles con grupos aminos catiónicos, obteniendo un tamaño de entre 90 nm y 120 nm, con sensibilidad a cambios de pH y temperatura importantes para cargado y liberación de fármacos como indometacina, donde al evaluar de manera *in vitro* la liberación de fármaco se obtuvo una liberación sostenida con respecto al tiempo y concentración. En las pruebas de citotoxicidad de observo una disminución en la viabilidad celular de un promedio de 40%. En los estudios *in vivo* con formalina mostraron una disminución del dolor y las pruebas de carragenina una disminución de la inflamación del sitio de daño con respecto a los controles. Estos resultados obtenidos nos permiten avanzar para realizar nuevos métodos de administración de fármacos, permitiendo que la administración de ellos sea más efectiva y eficaz en tiempos más prolongados, con menos efectos adversos y secundarios en pacientes con patologías progresivas y que sus tratamientos a largo plaza dejan de ser eficaces a corto o media plaza.

CONCLUSION 2

El método de polimerización en emulsión sin tensoactivo fue el mejor método para lograr una síntesis de nanogeles fluorescentes con las características adecuadas. Los nanogeles obtenidos con el método de polimerización utilizado produjeron nanogeles en orden nanométrico catiónicos con grupos amino, los cuales fueron sensibles al pH y a la temperatura importantes para estudios de liberación ya que los tejidos inflamados o dañados presentan un cambio en su temperatura y pH normal.

Los métodos utilizados para el cargado de nanogeles con indometacina fue

adecuado lo que permite evaluar su rendimiento y porcentaje de cargado para futuros estudios *in vivo* e *in vitro*. Los estudios de liberación de indometacina muestran un resultado favorable al obtener una liberación sostenida esto en relación con la concentración de fármaco liberado y tiempo.

La evaluación de la viabilidad celular con respecto a las distintas formulaciones de nanogeles nos muestras una citotoxicidad para las células disminuyendo gradualmente la viabilidad de estas.

Las pruebas de inflamación con formalina en la primera fase no muestran un efecto en disminución del dolor ya que es más favorable en fármacos opioides, pero se observa en la fase dos una reducción en el dolor con respecto a los controles. COX-2 alcanza su expresión máxima 1 hora después de la inyección local de carragenina. La inyección de carragenina al 1% en la pata del ratón provoca un edema, era de esperarse el hallazgo de que un edema, después de la inyección subplantar de carragenina, y el efecto mayormente desinflamatorio de los nanogeles podría deberse a una mayor unión a enzimas o mediares de la inflamación.

CAPITULO VI

REFERENCIAS

1. Lechuga LM. Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. *Biotecnol Apl a la Salud Humana*. Published online 2010:100–102. http://digital.csic.es/handle/10261/44635

2. Al-Lawati H, Binkhathlan Z, Lavasanifar A. Nanomedicine for the effective and safe delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of preclinical research. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;142(May):179–194. doi:10.1016/j.ejpb.2019.06.025

3. Colmenares D, Sun Q, Shen P, Yue Y, McClements DJ, Park Y. Delivery of dietary triglycerides to Caenorhabditis elegans using lipid nanoparticles: Nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chem*. 2016;202:451–457. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.022

4. 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

5. Kabanov A V., Vinogradov S V. Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angew Chemie - Int Ed*. 2009;48(30):5418–5429. doi:10.1002/anie.200900441

6. Alondra Montañez Rios, Aracely Serrano Medina, José Manuel Cornejo Bravo HMB. Síntesis de nanogeles de N-isopropilacrilamida y comonómero básico por emulsión sin detergente, con iniciadores catiónicos y aniónicos. Published online 2019.

7. Shen J, Xu J, Hu Y, Sun J wu, Li L xiao, Kan C you. Investigation of cationic soapless P(St-co-DMAEMA) latex and its electrostatic adsorption of laponite. *Chinese J Polym Sci (English Ed*. 2016;34(10):1240–1250. doi:10.1007/s10118-016-1829-x

8. Serrano-Medina A, Cornejo-Bravo JM, Licea-Claveríe A. Synthesis of pH and temperature sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *J Colloid Interface Sci*. 2012;369(1):82–90. doi:10.1016/j.jcis.2011.12.045

9. A Bernardi, ACCV Zilberstein, E Jäger, MM Campos, FB Morrone, JB Calixto, AR Pohlmann SG and AB. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules inexperimental models of inflammation in rats.pdf.

10. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(5):631–651. doi:10.1016/S0169-409X(02)00044-3

11. Manzanares-guevara LA, Licea-claverie Á, Graduados C De, Tijuana IT De, California B. En la citotoxicidad de un catiónico de amina terciaria PEGilado nanogel como nanotransportador para anticáncer terapias. 2019;(2018):1204–1210.

12. Nguyen TN, Yamada S. Forces at adhesive contacts. *New Cell Adhes Res*. Published online 2009:39–52.

13. Chu J, Wang X, Bi H, Li L, Ren M, Wang J. Dihydromyricetin relieves rheumatoid arthritis symptoms and suppresses expression of pro-inflammatory cytokines via the activation of Nrf2 pathway in rheumatoid arthritis model. *Int Immunopharmacol*. 2018;59(January):174–180. doi:10.1016/j.intimp.2018.04.001

14. Feldmann M. Pathogenesis of arthritis: Recent research progress. *Nat Immunol*. 2001;2(9):771–773. doi:10.1038/ni0901-771

15. Ekström SEA 1; KLAJGM. Tissue and intracellular pH in normal periarticular soft tissue and during different phases of antigen induced arthritis in the rat. *J Rheumatol*. 2000;27(3):825. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10493685/

16. Ameye LG, Chee WSS. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: A systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Res*

Ther. 2006;8(4):1–22. doi:10.1186/ar2016

17. Stewart AG. Mediators and receptors in the resolution of inflammation: Drug targeting opportunities. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):933–935. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00484.x

18. Recio Muñoz V. La inflamación. 2010;102:207–220. doi:10.1484/m.tema-eb.4.00396

19. Álvarez V, Monjil F, Soto V. Bioquímica y biología del cartílago articular. Published online 2002:391–400.

20. AMEPAR. Artritis reumatoide. Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con Artritis Reumatoide. Published 2018. https://amepar.org.mx/

21. Agarwal H, Shanmugam VK. Mechanism-based approach of medicinal plants mediated treatment of inflammatory disorders: A review. *South African J Bot*. 2022;147:380–390. doi:10.1016/j.sajb.2022.01.018

22. Daham K, James A, Balgoma D, et al. Effects of selective COX-2 inhibition on allergen-induced bronchoconstriction and airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(2):306–313. doi:10.1016/j.jaci.2013.12.002

23. Meckes* M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A. Actividad de algunos extractos de plantas medicinales mexicanas en edema de pata de rata inducido por carragenano. *Phytomedicine*. 2013;11:446–451.

24. Kohli P, Levy BD. Resolvins and protectins: Mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):960–971. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x

25. Luyten FP, Lories RJU, Verschueren P, de Vlam K, Westhovens R. Contemporary concepts of inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):829–848. doi:10.1016/j.berh.2006.06.009

26. Froldi M, Lazzarin A, Zanussi C. The inflammatory process. *Acta*

Otorhinolaryngol Ital. 1990;10 Suppl 2:11–21. doi:10.1097/00000441-196603000-00035

27. Zhang J, Koh J, Lu J, et al. Local inflammation induces complement crosstalk which amplifies the antimicrobial response. *PLoS Pathog*. 2009;5(1). doi:10.1371/journal.ppat.1000282

28. Binard A, Saraux A. Inflamación articular. *EMC - Apar Locomot*. 2006;39(2):1–21. doi:10.1016/s1286-935x(06)46541-2

29. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol*. 2005;117(2):104–111. doi:10.1016/j.clim.2005.08.004

30. Martín AP, Gómez AP, Gómez Lahoz AM, Escudero JB. Inflammation, activation of the vascular endothelium, and thrombosis. *Med*. 2021;13(33):1906–1916. doi:10.1016/j.med.2021.05.004

31. Yang Y, Zheng K, Mei W, et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of Ficus hirta in an in vivo zebrafish model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(2):763–769. doi:10.1016/j.bbrc.2018.01.071

32. Martínez MR, Morán-Álvarez P, Arroyo-Palomo J, Expósito MV, Díaz MV. Rheumatoid arthritis. *Med*. 2021;13(30):1669–1680. doi:10.1016/j.med.2021.03.027

33. Belvisi MG, Mitchell JA. Targeting PPAR receptors in the airway for the treatment of inflammatory lung disease. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):994–1003. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00373.x

34. Puebla F. Dolor Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS. Dolor iatrogénico. *Oncol*. 2005;28(3):139–143. https://scielo.isciii.es/pdf/onco/v28n3/06.pdf

35. Pireto Setién JM. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs). ¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos? *Cient Dent*. 2007;43(2):203–212.

http://www.coem.org.es/sites/default/files/revista/cientifica/vol4-n3/Revision.pdf

36. Prieto Setién JM. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos? *Cient Den*. 2007;3(203):212.

37. Colebatch AN, Marks JL, Edwards CJ. Seguridad de los fármacos antiinflamatorios no esteroides, incluida la aspirina y el paracetamol (acetaminofeno) en pacientes que reciben metotrexato para la artritis inflamatoria (artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, otras. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2012;23(4):502–503. doi:10.1016/s0716-8640(12)70341-3

38. Petta I, Peene I, Elewaut D, Vereecke L, De Bosscher K. Risks and benefits of corticosteroids in arthritic diseases in the clinic. *Biochem Pharmacol*. 2019;165(April):112–125. doi:10.1016/j.bcp.2019.04.009

39. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, et al. inducida por carragenina edema de la pata del ratón es bifásica , con la edad de peso dependiente y displays diferencial de óxido nítrico de la ciclooxigenasa-2 expresión. Published online 2004:331–338.

40. McCarberg BH, Cryer B. Evolving therapeutic strategies to improve nonsteroidal anti-inflammatory drug safety. *Am J Ther*. 2015;22(6):e167–e178. doi:10.1097/MJT.0000000000000123

41. Gómez López A. Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. *Repert Med y Cirugía*. 2017;26(3):129–130. doi:10.1016/j.reper.2017.06.003

42. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ Quim*. 2016;27(4):286–291. doi:10.1016/j.eq.2016.07.002

43. Lebreton V, Legeay S, Saulnier P, Lagarce F. Specificity of pharmacokinetic modeling of nanomedicines. *Drug Discov Today*. 2021;26(10):2259–2268. doi:10.1016/j.drudis.2021.04.017

44. Maher KO. *Nanomedicine and Nanotechnology for Heart Failure Research, Diagnosis, and Treatment*. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-802393-8.00060-0

45. Souris JS, Chen NT, Cheng SH, Chen CT, Lo LW. Silica Nanoparticle Platform. *Cancer Theranostics*. Published online 2014:363–391. doi:10.1016/B978-0-12-407722-5.00020-7

46. Marek SR, Conn CA, Peppas NA. Cationic nanogels based on diethylaminoethyl methacrylate. *Polymer (Guildf)*. 2010;51(6):1237–1243. doi:10.1016/j.polymer.2010.01.060

47. Zhang A, Jung K, Li A, Liu J, Boyer C. Recent advances in stimuli-responsive polymer systems for remotely controlled drug release. *Prog Polym Sci*. 2019;99:101164. doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.101164

48. Müller, C R, S R Schaffazick, A R Pohlmann, L de Lucca Freitas, N Pesce da Silveira, T Dalla Costa SSG. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*. 2001;56(11):864–867. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11817171/

49. Benjamin W. No Titיle. ペインクリニック学会治療指針２. 2019;3:1–9.

50. Suner SS, Sahiner M, Sengel SB, Rees DJ, Reed WF, Sahiner N. *Responsive biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications*. Elsevier Ltd.; 2018. doi:10.1016/B978-0-08-101997-9.00021-7

51. Castro-Vidal, D.a., Obeso-Vera, C., Suarez-Meraz, K. A., Lara-Molinero, B. M., Serrano-Medina AC-B. Thermal and Ph Sensitive Nano / Microgels of N - Isopropylacrylamide and Carboxyalkyl Methacrylates. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2016;11(1):123–132.

52. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem*. 2010;122(4):987–996. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.041

53. Marcelo G, Areias LRP, Macoas E, Mendicuti F. Structural color and rheology of self-assembled poly (N-isopropylacrylamide- methacrylic acid) microgels in water. *Eur Polym J*. 2019;113(October 2018):349–356. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.01.070

54. Strachota B, Oleksyuk K, Strachota A, Šlouf M. Porous hybrid poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with very fast volume response to temperature and pH. *Eur Polym J*. 2019;120(July). doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109213

55. Bravi Costantino ML, Cortizo MS, Cortizo AM, Oberti TG. Osteogenic scaffolds based on fumaric/N-isopropylacrylamide copolymers: Designed, properties and biocompatibility studies. *Eur Polym J*. 2020;122(November 2019):109348. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109348

56. Molina M, Bergueiro J. Aplicaciones Biomédicas De Nanogeles Dendríticos Termosensibles. *Rev Iberoam Polim*. 2015;16(3):164–172.

57. Xue H, Zhao Z, Chen R, Brash JL, Chen H. Precise regulation of particle size of poly(N-isopropylacrylamide) microgels: Measuring chain dimensions with a “molecular ruler”. *J Colloid Interface Sci*. 2020;566:394–400. doi:10.1016/j.jcis.2020.01.076

58. Alberto J, Ortega C. Síntesis de Hidrogeles Termosensibles de poli (N -isopropilacrilamida) -co-poli (N , N , -dimetilacrilamida). Published online 2013.

59. Chevalier MT, Gonzalez J, Alvarez V. Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. *IFMBE Proc*. 2015;49:187–190. doi:10.1007/978-3-319-13117-7_49

60. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*. 2010;148(2):135–146. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027

61. Zhang H, Xue Y, Huang J, et al. Tailor-made magnetic nanocarriers with pH-induced charge reversal and pH-responsiveness to guide subcellular release

of doxorubicin. *J Mater Sci*. 2015;50(6):2429–2442. doi:10.1007/s10853-014-8798-7

62. Yuan J, Ran X, Liu K, et al. Jo rn a l P re. *J Neurosci Methods*. Published online 2021:109441. doi:10.1016/j.psep.2022.03.075

63. Kitchell JP, Wise DL. [32] Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems. *Methods Enzymol*. 1985;112(C):436–448. doi:10.1016/S0076-6879(85)12034-3

64. Martín Giménez VM, Ruiz-Roso MB, Camargo AB, Kassuha D, Manucha W. Nanotechnology, a new paradigm in atherosclerosis treatment. *Clínica e Investig en Arterioscler (English Ed*. 2017;29(5):224–230. doi:10.1016/j.artere.2017.09.001

65. Wu T, Xu H, Liang X, Tang M. Caenorhabditis elegans as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. *Chemosphere*. 2019;221:708–726. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.021

66. Leme Jg, Hamamura L, Leite Mp, Silva Mre. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *Br J Pharmacol*. 1973;48(1):88–96. doi:10.1111/j.1476-5381.1973.tb08225.x

67. Gonzalez-Moragas L, Roig A, Laromaine A. C. elegans as a tool for in vivo nanoparticle assessment. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015;219:10–26. doi:10.1016/j.cis.2015.02.001

68. Rostom A, Goldkind L, Laine L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hepatic toxicity: A systematic review of randomized controlled trials in arthritis patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(5):489–498. doi:10.1016/S1542-3565(04)00777-3

69. Baigent C, Bhala N, Emberson J, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2013;382(9894):769–779.

doi:10.1016/S0140-6736(13)60900-9

70. Mitra I, Mukherjee S, Reddy Venkata PB, et al. Benzimidazole based Pt(II) complexes with better normal cell viability than cisplatin: Synthesis, substitution behavior, cytotoxicity, DNA binding and DFT study. *RSC Adv*. 2016;6(80):76600–76613. doi:10.1039/c6ra17788c

71. Medel Fernández S. Polímeros hiperramificados fluorescentes. Síntesis, propiedades y aplicaciones como sensores. Published online 2014:259.

72. Martínez MT, Moctezuma CL. Métodos Fisico-Químicos en Biotecnología. Espectrofluorimetría. *Temas Métodos*. Published online 2006:67. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf

73. González Pérez C. Metodos luminiscentes. Published online 2002:2–30.

74. Mondragón Cortez P. *Espectroscopia de infrarrojo para todos*.; 2015. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf

75. Joseph R.Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edit. (Springer Science, ed.).; 2006.

76. Figure 1 The workhouse in Colchester Figure 2 Professor Campbell in Colchester African countries BIOCHEMICAL EDUCATION 22 (2) 1994 Molecular Probes : Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Published online 1994:97402.

77. Shakoori Z, Ghanbari H, Omidi Y, et al. Fluorescent multi-responsive cross-linked P(N-isopropylacrylamide)-based nanocomposites for cisplatin delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017;43(8):1283–1291. doi:10.1080/03639045.2017.1313859