

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



“Síntesis de nanopartículas de poli(ácido metacrilóiloxi-*o*-benzoico), sensibles al pH y su liberación de ácido salicílico”

TESIS

Para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

Por

HATZIRI ITZAYANA PEÑA PEÑA

Director de tesis

Dr. Héctor Manuel Magaña Badilla

Co-Director de tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaíno

Tijuana B.C., a agosto de 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 045

Tijuana, Baja California, a 26 de agosto de 2020

C. Hatziri Itzayana Peña Peña
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente:

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


Es propuesto, por el Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y la Dra. Kenia Palomino Vizcaino quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Síntesis de nanopartículas de poli (ácido metacrililoixi-0-benzoico), sensibles al pH y su liberación de ácido salicílico" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II. INTRODUCCIÓN
- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V. CONCLUSIONES
- VI. REFERENCIAS
- VII. ANEXOS





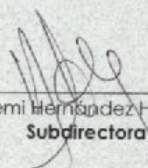
Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director de Tesis



Dra. Kenia Palomino Vizcaino
Co- Directora de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Director



Q. Noemi Hernández Hernández
Subdirectora

| CONTENIDO | PÁGINA |
|--|---------------|
| Hoja de aprobación | 1 |
| Lista de figuras | 4 |
| Lista de tablas | 5 |
| Agradecimientos | 6 |
| Resumen | 7 |
| | |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN. | |
| I.1 Antecedentes | 8 |
| I.2 Hipótesis | 10 |
| I.3 Justificación | 11 |
| I.4 Objetivo general | 12 |
| I.5 Objetivos específicos | 12 |
| I.6 Marco teórico | 13 |
| I.6.1 Monómero | 13 |
| I.6.2 Polímero | 14 |
| I.6.3 Aplicaciones de los polímeros | 15 |
| I.6.4 Polímero profármaco | 15 |
| I.6.5 Nanopartículas | 16 |
| I.6.6 Tipos de liberación de fármacos | 19 |
| | |
| CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL | |
| II.1 Equipos y reactivos | 21 |
| II.2 Purificación de EDGMA | 23 |
| II.3 Síntesis de monómero ácido metacrililoixi- <i>o</i> -benzoico (MAOB) | 23 |
| II.4 Caracterización de MAOB | 24 |
| II.4.1 Cromatografía de capa fina (CCF) | 24 |
| II.4.2 Espectrofotometría de Infrarrojo por transformada de Fourier, con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) | 25 |
| II.4.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN- H^1) | 25 |
| II.5 Generación de sal de MAOB | 25 |
| II.6 Caracterización de sal de MAOB | 26 |
| II.7 Síntesis de nanopartículas | 26 |
| II. 8 Caracterización de nanopartículas | 27 |
| II.9 Generación de liofilizado de nanopartículas | 27 |
| II.10 Estudio de hidrólisis - liberación | 27 |
| II.11 Evaluación de ácido salicílico por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) | 29 |
| II.12 Evaluación de liberación de ácido salicílico por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) | 30 |

| | |
|--|----|
| II.12.1 Preparación de soluciones | 30 |
| II.12.2 Condiciones cromatográficas | 31 |
| CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES | |
| III.1 Síntesis de monómero de ácido metacrililoxi- <i>o</i> -benzoico (MAOB) | 32 |
| III.2 Caracterización de MAOB | 32 |
| III.2.1 Cromatografía de capa fina | 32 |
| III.2.2 Espectrofotometría de infrarrojo por transformada de Fourier, con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) | 33 |
| III.2.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN- H^1) | 35 |
| III.3 Caracterización de sal de MAOB | 36 |
| III.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) | 37 |
| III.4. Caracterización de nanopartículas | 39 |
| III.4.1 Determinación de tamaño de partícula por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) | 39 |
| III.5 Estudio de hidrólisis - liberación | 39 |
| III.6 Evaluación de liberación de ácido salicílico por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) | 40 |
| III.7 Evaluación de liberación de ácido salicílico por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) | 41 |
| CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES | 43 |
| CAPÍTULO V. ANEXOS | 45 |
| CAPÍTULO VI. REFERENCIAS | 47 |

LISTA DE FIGURAS

1. Molécula de estireno.
2. Estructura de polietileno.
3. Liberación de hidrólisis dependiente de ácido salicílico.
4. Esquema de la administración y liberación del fármaco de las nanopartículas.
5. Representación gráfica de los distintos tipos de liberación de fármacos.
6. Ruta de síntesis de ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico.
7. Ruta de síntesis de sal de MAOB.
8. Representación de sistema de hidrólisis-liberación de ácido salicílico a partir de nanopartículas poliméricas. Poli(MAOB) en forma de sal (A) y ácido salicílico (B).
9. Cromatografía en capa fina.
10. Espectro de infrarrojo del monómero de MAOB.
11. Espectro de RMN-¹H del monómero de MAOB.
12. Espectro de infrarrojo de nanopartículas poliméricas de MAOB en forma de sal.
13. Espectro IR comparativo entre MAOB y nanopartículas poliméricas de MAOB en forma de sal.
14. Distribución de tamaño de partícula.
15. Hidrólisis - Liberación de ácido salicílico a partir de MAOB, por medio de nanopartículas poliméricas en forma de sal.
16. **a)** Espectro de masas de ácido salicílico obtenido a partir del medio de liberación. **b)** Espectro de referencia de ácido salicílico, obtenido de NIST Standard Reference Database 69: *NIST Chemistry WebBook*.
17. Cromatogramas de ácido salicílico a) estándar de referencia, b) muestra de nanopartículas poliméricas de MAOB.
18. Curva de calibración a pH 1.2.
19. Curva de calibración a pH 6.8.
20. Curva de calibración a pH 7.4.

LISTA DE TABLAS

- 1.** Condiciones cromatográficas para el análisis.
- 2.** Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR de MAOB.
- 3.** Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR de la sal de MAOB

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al fruto de un esfuerzo conjunto, no solo el mío. Por lo tanto, agradezco a Dios y a mi familia por acompañarme en este camino. Al Dr. Héctor Magaña y la Dra. Kenia Palomino, por apoyarme, instruirme, guiarme y aportarme sus conocimientos, gracias infinitas. Al Dr. José Cornejo, por permitirme hacer uso del laboratorio en el que se realizó la parte más bonita e importante de este trabajo, así como también por sus consejos e intervenciones. Gracias, también, a mis compañeros de carrera y ahora colegas, los químicos Ángel Medina y Hebrón Vázquez, por su compañía y apoyo dentro y fuera del laboratorio. Finalmente, gracias a mis dos amigas, Cristal y Laura, por animarme siempre.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por formarme durante 4 años, por darme acceso a sus instalaciones y recursos, por permitirme conocer a grandes profesionales, logrando aprender de ellos y con ellos. Siempre estaré agradecida con esta institución, mi alma mater.

AGRADECIMIENTO CONACYT

Se agradece al proyecto N. A1-S-29189, titulado “Evaluación de la Actividad Citotóxica de los Beta Bloqueadores en líneas Celulares derivadas de Tumores y Leucemias”, el cual funge como plataforma para la incorporación en estudios de maestría.

RESUMEN

En este trabajo se presenta un profármaco polimérico con características nanométricas, sintetizado a partir del monómero ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB), por medio de una reacción de polimerización, en la cual se utilizó etilenglicol dimetacrilato (EDGMA) como entrecruzante y persulfato de amonio (APS) como iniciador de la reacción polimérica. El profármaco polimérico fue sometido a diferentes pruebas para su caracterización, realizadas por medio de técnicas analíticas, así como también, se realizó un estudio de hidrólisis - liberación para conocer su dependencia a pH's fisiológicos.

Para la caracterización del monómero, se utilizó cromatografía de capa fina (CCF), espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H). Después de someter el monómero a una reacción de polimerización, para la obtención de nanopartículas poliméricas, a estas se les midió su tamaño por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Las nanopartículas sintetizadas fueron liofilizadas y sometidas a un estudio de hidrólisis - liberación a 3 pH's fisiológicos simulados: 1.2, 6.8 y 7.4. A las nanopartículas liberadas en solución a pH 6.8 se les evaluó por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Dado los resultados obtenidos, se encontró que el profármaco polimérico sintetizado a partir de MAOB, efectivamente presenta características nanométricas (297 nm) y además es dependiente a pH's fisiológicos, ya que se apreció la liberación del fármaco en los 3 pH's, siendo mayor a pH 1.2 (5.5 mg en 2.5 horas). Por lo cual, se plantea que esto se efectúa por medio de un mecanismo de hidrólisis en el cual obtendremos como producto la liberación del fármaco ácido salicílico, esto debido al enlace lábil tipo éster que presenta la molécula del profármaco. Por lo tanto, este profármaco polimérico podría presentarse como una opción para superar las limitantes de la administración de medicamentos, pues gracias a sus características se puede mejorar su liberación, distribución y efectividad.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

I.1 ANTECEDENTES

En los últimos años, se han buscado sistemas que ayuden a superar las limitaciones de la administración de medicamentos convencionales, como lo son: la efectividad limitada, la deficiente distribución y su toxicidad. Por lo cual, se ha llevado a un gran desarrollo de los sistemas de administración de fármacos, los cuales son tecnologías diseñadas para la administración dirigida y / o la liberación controlada de agentes terapéuticos. ¹

La investigación actual sobre sistemas de administración de fármacos se puede describir en cuatro amplias categorías: vías de administración, vehículos de administración, carga, y estrategias de localización. ¹

En la categoría de vehículos de administración, se ha planteado el uso de nanotecnología, más específicamente, el uso de nanopartículas. La convergencia de la nanotecnología con otras disciplinas como las ciencias de los materiales, la biología celular y molecular, las ciencias farmacéuticas y la medicina ha generado gran revolución tecnológica que se vislumbra como la de mayor impacto en el futuro debido a sus potenciales aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Kumar, Mansour, Friedman y Blough, 2013). Gracias a esta convergencia con otras disciplinas, se ha llevado al nacimiento del concepto de *nanomedicina*, el cual, según la organización The European Science Foundation, después de intensos debates, la definió como aquella aplicación de la nanotecnología al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades y, en consecuencia, al entendimiento de los procesos patofisiológicos que intervienen en el origen y curso de una enfermedad determinada (Duncan y Gaspar, 2011). ²

La nanomedicina, propone que los sistemas de liberación se deben desarrollar para identificar el sitio blanco, el cual puede ser un órgano, una célula, un compartimento celular (núcleo, citoplasma) o incluso, un organelo (Maity y Stepensky, 2015), dirigirse a él y

entregar selectivamente su carga terapéutica. Además, la entrega del fármaco deberá ser de manera controlada en respuesta a un estímulo interno o externo (Mura, Nicolas y Couvreur, 2013) y que podrán transportar simultáneamente varios fármacos y/o biomacromoléculas (péptidos, proteínas y ácidos nucleicos). Los sistemas más sofisticados, llamados también plataformas multifuncionales de liberación de fármacos, incluyen componentes que permiten rastrearlo por técnicas de figura y sirven para el diagnóstico e identificación del estadio de determinada patología (Mura et al., 2013, Kemp et al., 2015, Mura y Couvreur, 2012).²

Existe una gran variedad de nanopartículas para transportar y liberar fármacos en respuesta a un estímulo. Dicho estímulo puede ser interno (pH, concentración de enzimas o de metabolitos y gradiente redox) o externo (temperatura, campo magnético, ultrasonido y luz). Logrando así, controlar la liberación de principio activo en el espacio y / o tiempo. Específicamente, a estos sistemas, se les denomina: sistemas de liberación de fármacos estímulo - respuesta o inteligentes. Los materiales que los constituyen deben experimentar una protonación específica, una escisión hidrolítica, cambios moleculares o supramoleculares en respuesta al estímulo o ser susceptibles a una estimulación física concreta.³

La primera vez que se usó el concepto de liberación de fármacos estímulo - respuesta, fue en 1978. Se desarrollaron liposomas cargados con el antibiótico neomicina, el cual se liberaba al aumentar la temperatura (44 °C) mientras que se retenía a temperatura fisiológica (37 °C).³

Por otro lado, el uso de moléculas de fármacos para construir sistemas de suministro de nanofármacos basados en profármacos poliméricos han captado gran atención. Los polímeros fueron incluidos oficialmente en el campo farmacéutico en 1980 en la Farmacopea Americana (USP) y desde entonces se han empleado como auxiliares de formulación en medicamentos (Martin, 1993; USP, 2006).

Los profármacos poliméricos como sistemas de administración de fármacos pueden proporcionar muchas ventajas, como: la liberación selectiva de fármacos en tejidos o células diana; la mejora en la solubilidad en agua de los fármacos hidrófobos; la prevención de la liberación prematura de fármaco y evitar la degradación y / o desactivación del fármaco en la etapa de liberación; ayudan a prolongar el tiempo del fármaco en circulación sanguínea; aumentan la acumulación de fármaco en tejido tumoral, debido al efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR).⁵

El ácido salicílico en conjunto con poliésteres y alcohol polivinílico, es un ejemplo de profármaco polimérico, pues se ha observado que da como resultado una liberación hidrólisis - dependiente del fármaco. Dicho fármaco pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) y se estima que su origen deriva de la salicina, un extracto activo de la corteza del sauce blanco (*Salix alba*), el cual fue aislado y nombrado por el químico alemán Johann Andreas Buchner en 1828. En 1829, fue aislado por Henri Leroux, un farmacéutico francés, y el 1838, Raffaele Piria, un químico italiano, logró convertir esta sustancia en un azúcar y un segundo componente, que por oxidación se convirtió en lo que hoy conocemos como ácido salicílico.^{6, 28}

El ácido salicílico, es comúnmente utilizado con fines terapéuticos, pues presenta buenas propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, analgésicas y antimicrobianas.

I.2 HIPÓTESIS

La hidrólisis - liberación de ácido salicílico a partir de nanopartículas poliméricas de ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB), podría ser dependiente de pH's fisiológicos, debido al enlace lábil tipo éster que presenta el sistema diseñado y aplicarse como una propuesta de sistema de liberación de fármaco a escalas nanométrica.

I.3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la aparición de enfermedades y trastornos, la forma de dosificación específica adecuada ha adquirido gran importancia para tratar enfermedades y mejorar la salud del paciente. Las formas de dosificación convencionales tienen muchas deficiencias, como lo son: la administración repetida del medicamento con un tiempo de vida media corto, una disminución de la adherencia al tratamiento del paciente, la efectividad limitada, la deficiente distribución, su toxicidad, un perfil típico de concentración plasmática pico - valle, por lo cual no se puede lograr una dosificación dirigida, entre otras.

Se ha demostrado que, a medida que el número de medicamentos y/o de administraciones por día aumenta, disminuye el cumplimiento terapéutico.⁸ Además, se han encontrado cifras de cumplimiento del 84% para medicamentos que se administran una vez al día, contra el 59% cuando se administra tres veces al día. Por otro lado, las alteraciones en el estilo de vida como: la dificultad en seguir el horario pautado, especialmente si afecta las horas de descanso nocturno, y tratamientos que implican cambios de hábitos alimenticios, o interfieren en los horarios de trabajo o en la vida social, suponen un obstáculo para el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.⁹

Debido a todas aquellas limitaciones de la administración de medicamentos convencionales, se han buscado alternativas que ayuden a superarlas, como lo es la dosificación modificada y dirigida, utilizando sistemas poliméricos biocompatibles como base estructural y sistemas nanométricos.⁷

Existen estructuras nanométricas profármaco poliméricas, basadas en respuestas a estímulos, como cambios en el pH y temperatura, estas han dado buenos resultados gracias a su tamaño de partícula pequeño, el cual es determinante en la velocidad de disolución, pues mientras menor sea su tamaño, mayor será el área superficial disponible para la disolución, además cuentan con estabilidad y eficacia contra tumores malignos, gracias a la retención y permeabilidad que se logra en las células tumorales.⁷ Adicionalmente, existen

nanotransportadores anticancerígenos que utilizan la ligera diferencia en el pH entre los tejidos sanos (pH= 7.4) y el medio extracelular de los tumores sólidos (pH= 6.5-7.2).³

Por otro lado, las infecciones bacterianas también se caracterizan por valores bajos de pH debidos a la fermentación anaerobia y a la inflamación, por lo cual con la ayuda de nanotransportadores poliméricos sensibles a pH y cargados con antibiótico, se puede lograr, por medio de interacciones electrostáticas con los elementos de carga negativa de la pared bacteriana, la liberación del antibiótico.^{3,10}

Por lo tanto, con este trabajo, se justifica la propuesta de un sistema que consiste en nanopartículas poliméricas capaces de hidrolizarse y liberar ácido salicílico cuando se somete a estímulos, como lo son los cambios de pH y temperatura, los cuales podrían permitir una liberación de fármaco dirigida y específica en el sitio de interés y a distintas zonas del organismo, permeando barreras fisiológicas especiales, superando las limitaciones que tienen las formas de administración de medicamento convencionales, lo cual podría ayudar en el tratamiento de patologías como las infecciones e inflamaciones, así como propiciar el aumento de la biodisponibilidad y reducir efectos adversos. Logrando con ello una terapia inteligente o a la medida de las necesidades del paciente.

I.4 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanopartículas poliméricas a partir del monómero ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB), su caracterización y estudio hidrólisis-liberación de ácido salicílico a diferentes pH's fisiológicos simulados.

I.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I.5.1. Sintetizar el monómero ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB) y su purificación.

I.5.2. Caracterización del monómero por medio de espectrofotometría de infrarrojo (FTIR-ATR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H).

I.5.3. Sintetizar nanopartículas poliméricas a partir del monómero ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) y caracterizarlas por medio de FTIR-ATR.

I.5.4. Realizar estudios de hidrólisis - liberación del ácido salicílico en 3 pH's fisiológicos simulados y cuantificarlo por medio de espectrofotometría de UV-Vis y caracterizarlo por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).

I.6 MARCO TEÓRICO

I.6.1 Monómero

Un monómero, deriva del griego *mono* y *meros* que significan *uno* y *parte*, respectivamente. Este es una molécula de pequeña masa molecular que pueden estar unida a otras moléculas o monómeros, a veces cientos o miles, por medio de enlaces químicos y forman macromoléculas llamadas polímeros. ¹¹

Un monómero es capaz de formar enlaces covalentes con una secuencia de moléculas adicionales similares o distintas, cuando se somete a condiciones de una reacción de polimerización. Es decir, mediante esta reacción, se convierte en una unidad repetida de la secuencia de polímeros. ¹²

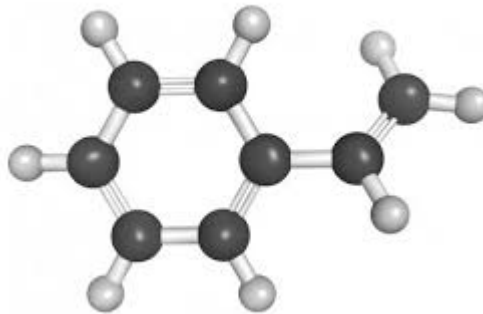


Figura 1. Molécula de estireno.

El estireno (**Figura 1**) es un monómero ampliamente utilizado en la actualidad, el cual puede polimerizarse fácilmente cuando es expuesto a calor, luz o catalizadores de peróxido, formado el poliestireno. ¹³

I.6.2 Polímero.

La palabra polímero deriva del griego *poli* y *meros*, que significan *mucho* y *partes*, respectivamente. Este término ha sido definido como una macromolécula o molécula de gran tamaño. Los polímeros son compuestos orgánicos y cuentan con un alto peso molecular, además, se conforman, como su nombre lo dice, por muchas unidades estructurales repetitivas, es decir, por monómeros. ^{11, 14}

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, Los polímeros se caracterizan por tener un bajo punto de fusión, baja densidad, pobre conductividad eléctrica y térmica, así como poca reactividad química. ¹⁴

Se clasifican dependiendo de su origen en naturales o sintéticos. Los sintéticos contienen, por lo regular, entre uno y tres tipos distintos de unidades que se repiten, mientras que los naturales o biopolímeros (celulosa, ADN o proteínas), presentan estructuras mucho más complejas. En la actualidad, los polímeros sintéticos son los que han llamado más el interés en el ámbito comercial. ¹⁴

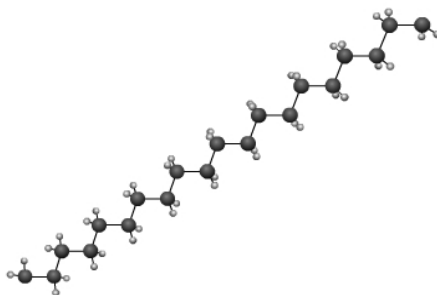


Figura 2. Estructura del polietileno.

El polietileno (**Figura 2**) es un polímero de cadena repetitiva de etileno (CH₂)_n. Es una molécula compuesta por al menos mil unidades de etileno unidas por enlaces covalentes. Este se caracteriza por tener propiedades químicas y mecánicas sobresalientes, destacándose su lubricidad, resistencia al impacto y abrasión, y por ser químicamente inerte.¹⁵

1.6.3 Aplicaciones de los polímeros.

Las aplicaciones de los polímeros cada vez son mayores y diversas, pues estos son constituyentes importantes de muchos materiales, como los utilizados en equipos electrónicos, en los medios de transporte, en el instrumental utilizado en la ciencia médica, en los tejidos con que se conforma la tela de la ropa, en los empaques y embalajes que permiten el mejor almacenamiento de mercancías, y de infinidad de pequeños y grandes objetos que forman parte de nuestra vida diaria.¹⁶ Sin embargo, en los últimos años, los polímeros también han sido utilizados para la mejora de la liberación de fármacos, siendo una interesante propuesta y alternativa.

1.6.4 polímero profármaco.

Actualmente, el uso de polímeros para aplicaciones biomédicas ha captado gran atención, particularmente en el uso mejorado de fármacos, pues se han realizado diseños conjugados polímero-fármaco o profármacos poliméricos.^{17, 26}

La unión química de medicamentos de bajo peso molecular a polímeros sintéticos o naturales se ha investigado con la finalidad de mejorar la eficacia de los dispositivos de liberación de control de medicamentos a través de una liberación constante pero prolongada de medicamentos, generando efectos secundarios mínimos. Los fármacos pueden estar unidos a los vehículos poliméricos utilizando una serie de reacciones químicas con participación de grupos funcionales tales como hidroxilo o carboxilo que están presentes originalmente en la cadena del polímero o formados alternativamente por funcionalización. Otra posibilidad es el uso de monómeros funcionalizados en la síntesis de un precursor polimérico reactivo.¹⁷

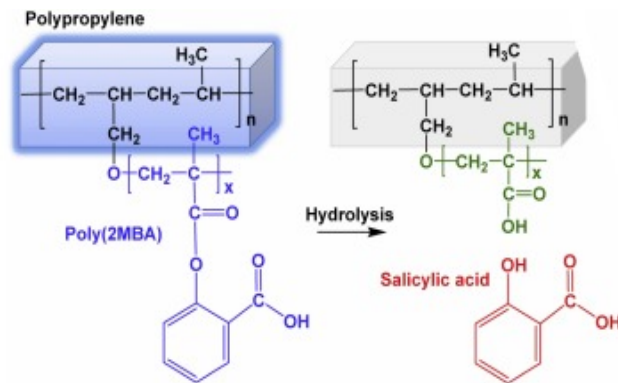


Figura 3. Liberación de hidrólisis dependiente de ácido salicílico.

Un ejemplo de profármaco polimérico es el ácido salicílico (**Figura 3**) en conjunto con poliésteres y alcohol polivinílico, pues se ha observado que da como resultado una liberación hidrólisis - dependiente del fármaco. El ácido salicílico es comúnmente utilizado con fines terapéuticos, pues presenta buenas propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, analgésicas y antimicrobianas. Además, se sabe que los salicilatos inducen la apoptosis en las células cancerosas. En los últimos años se han presentado muchos estudios sobre la síntesis e hidrólisis de conjugados de profármacos poliméricos con AINE's como el naproxeno, indometacina, ibuprofeno, ketoprofeno y fenoprofeno. ^{6, 26}

I.6.5 Nanopartículas.

Las nanopartículas (NPs) son partículas coloidales, las cuales se definen como la distribución de partículas o partículas sólidas. La palabra "nano" deriva de "nanos", es una palabra griega que significa "extremadamente pequeño". ¹⁸

La primera vez que se utilizó el término de nanopartícula para la liberación de fármacos fue en 1976 para describir unas partículas poliméricas de 100 nm que transportaban viriones.

¹⁹ The Royal Society and Royal Academy of Engineering propuso en 2004 una definición de nanopartícula según la cual su tamaño oscila entre 1 y 100 nm. Sin embargo, no todas las NPs usadas con fines médicos cumplen esta definición.²⁰ En realidad, no hay una razón específica por la que establecer el límite superior en 100 nm. El principio fundamental que diferencia a las NPs del resto no es el tamaño, sino que tienen nuevas características que

no presentan los mismos materiales en mayores dimensiones como, por ejemplo, que su superficie en proporción a su masa es mucho mayor que en otras partículas.²¹ Por eso, en nanomedicina los sistemas considerados NPs para la liberación de fármacos oscilan entre 10 nm y 1000 nm. Al ser de tamaño pequeño, las nanoestructuras presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas (por ejemplo, un área reactiva aumentada con la capacidad de atravesar barreras celulares y tisulares) que las convierten en un material recomendable para aplicaciones biomédicas.²²

Las nanopartículas son de gran interés por dos motivos principales: en primer lugar, es posible conseguir un nivel terapéutico apropiado durante periodos de tiempo mayores de los que se consiguen mediante administraciones convencionales, además de poder ayudar en el tratamiento de infecciones de tipo crónico que necesitan medicación constante. En segundo lugar, tienen la capacidad de dirigir el efecto del fármaco al tejido enfermo en vez de distribuirlo por todo el organismo, esto es de gran importancia cuando se trata con fármacos con alta toxicidad sistemática, como los anticancerígenos.²³

Existen diferentes tipos de nanopartículas dependiendo de su morfología y propiedades físicas o químicas, como lo son: las nanopartículas a base de carbono, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas metálicas, las nanopartículas cerámicas, las nanopartículas semiconductoras y las nanopartículas a base de lípidos, por mencionar algunas. De estas, las nanopartículas poliméricas son las más investigadas debido a sus ventajas sobre las otras pues son de fácil preparación, y en nanomedicina se utilizan por tener buena retención y protección de medicamento.²⁴ Además, permiten lograr un suministro mejorado de fármacos (poco solubles en agua y de tamaño de partícula pequeño) a sitios de difícil acceso, después de un proceso de administración, favoreciendo así una disolución más rápida en el torrente sanguíneo, lo que lleva al suministro dirigido de forma específica a células o tejidos, aumentando la eficacia terapéutica del fármaco y reduciendo los efectos secundarios, así como el uso de diversas vías de administración (parenteral, intraocular, oral, nasal, entre otras).^{22, 25}

Las NPs se clasifican, atendiendo a su composición, en NPs orgánicas (poliméricas, dendrímeros, liposomas y micelas) y en NPs inorgánicas (de oro, de óxidos de hierro, de sílice mesoporosa y nanotubos de carbono). También hay nanotransportadores que combinan los dos tipos de componentes, son las NPs híbridas. Los fármacos pueden incorporarse por encapsulación (en cuyo caso quedan recluidos en el interior del sistema), por adsorción a su superficie, por absorción y por conjugación (de este modo el principio activo queda unido covalentemente al nanotransportador). Esto depende del método de síntesis utilizado.^{22, 24}

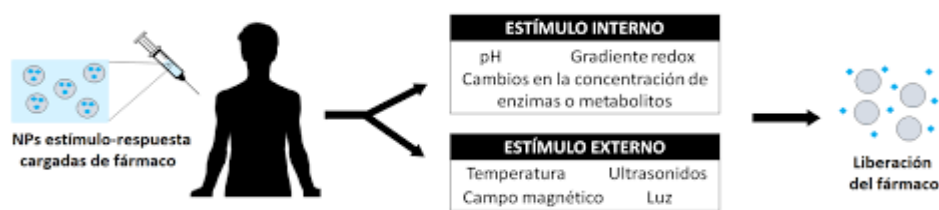


Figura 4. Esquema de la administración y liberación del fármaco de las nanopartículas.

Por otro lado, se sabe que ciertos agentes de contraste de imagen pueden incorporarse dentro de las nanopartículas, permitiendo la visualización del sitio de administración del fármaco o para monitorear la eficacia *in vivo* del agente terapéutico.²²

Entre sus ventajas, las nanopartículas preparadas a partir de polímeros naturales o sintéticos son económicas, no tóxicas, biodegradables, no trombogénicas, no inmunogénicas, no inflamatorias con un diámetro de partículas pequeño e inhiben la agregación plaquetaria.²⁵

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado más de dos docenas de productos de nanotecnología para uso clínico, y muchos nanoproductos potenciales aún se encuentran en desarrollo clínico y preclínico. Por lo tanto, se espera que la investigación y el interés en este campo sea cada vez mayor.²⁵

I.6.6 Tipos de liberación de fármacos.

Los sistemas de liberación se han desarrollado con la finalidad de modificar la vía de administración en beneficio del paciente, mejorar la biodisponibilidad, cambiar el perfil de liberación o mejorar una formulación para una nueva presentación y línea de venta.

Un sistema o forma farmacéutica convencional o de liberación inmediata (FLI o SLI) comienza a liberar el principio activo a los pocos minutos de ser administrada. Cuando se realizan modificaciones en la velocidad, el lugar o el momento de liberación del principio activo, nos encontramos ante un sistema o forma farmacéutica de liberación modificada (FLM o SLM). ²

Los sistemas de liberación de fármacos se pueden clasificar en: ²

Sistemas de liberación inmediata: en esta clasificación se encuentran las formas farmacéuticas convencionales, estas se caracterizan porque liberan sus componentes activos de manera inmediata hacia el lugar de absorción.

Sistemas de liberación retardada: sucede cuando la liberación del principio activo se retrasa, ya que se libera en un momento distinto al de la administración, pero sin prolongar el efecto terapéutico (no hay cambios en ningún otro parámetro terapéutico).

Sistemas de liberación controlada: en estos, el principio activo se libera escalonadamente en el tiempo, alargándose el efecto terapéutico. A su vez, este tipo de liberación se clasifica en:

- *Sistemas de acción sostenida:* el principio activo se libera a una velocidad constante, con el objetivo de conseguir una velocidad de absorción también constante y así evitar las fluctuaciones de los niveles plasmáticos de principio activo, reduciendo con ello los efectos adversos.
- *Sistemas de acción prolongada:* en estos sistemas, el principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir efecto terapéutico y

posteriormente lo hace de forma más lenta, manteniendo la concentración eficaz, con lo que se consigue alargar el efecto terapéutico.

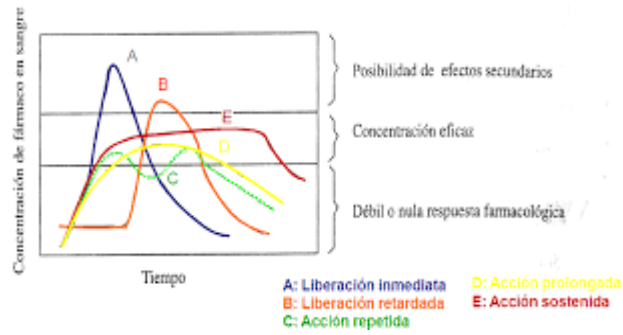


Figura 5. Representación gráfica de los distintos tipos de liberación de fármacos.

CAPÍTULO II

II. EXPERIMENTAL

II. 1 EQUIPOS Y REACTIVOS

a. Equipos

1. Agitador magnético VWR Dyla-Dual.
2. Balanza analítica, marca Denver Instrument M-200.
3. Baño de temperatura, marca VWR International Shel Lab modelo 1217.
4. Bomba de adición, marca RAZEL, modelo R-99.
5. Bruker (RMN).
6. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC- MS).
7. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR).
8. Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Equipo ZetaSizer Nano-ZS series, de marca Malvern Instruments, modelo ZEN3500 con láser verde de 532 nm, serie MAC5000833.
9. Espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR).
10. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Beckman Coulter DU520, Single Cell module.
11. Equipo de filtración con membrana millipore Superlco, Life Sciences GHP Acrodisc 25mm Syringe Filter 0.2um, filtros Suport-100 0.2um 47mm PN60310.
12. Estufa de vacío WVR.
13. Liofilizador Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 cyclos.
14. Potenciómetro, 430 Corning. o Potenciómetro HANNA, modelo HI 2210.
15. Purificador de agua, marca Barnstead Sybron, modelo D2604.
16. Recirculador de agua con temperatura controlada, Cole-Parmer Polystat modelo 12101-10.
17. Recirculador de agua con temperatura controlada, marca LAUDA Brinkmann, ecoline RE106.

b. Reactivos, solventes y Gases

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

1. Ácido clorhídrico
2. Ácido salicílico
3. Agua destilada
4. Anhídrido metacrílico
5. Diclorometano
6. Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA)
7. Etanol
8. Éter etílico
9. Fosfato de potasio monobásico
10. Fosfato dibásico de sodio
11. Hexano
12. Hidróxido de sodio
13. Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO: 12-14,000
14. Metanol
15. Nitrógeno grado alta pureza
16. Persulfato de amonio (APS)
17. Poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (1,100 g/mol) (PEGMA1100)
18. Removedor del inhibidor hidroquinona
19. Sulfato de Magnesio anhidro, 99% (MgSO₄)
20. Tetrametilendiamina
21. Trietilamina

II. 2 PURIFICACIÓN DE EGDMA

Se eluyó el entrecruzante EGDMA (dimetacrilato de etilenglicol) por una columna empacada con removedor del inhibidor de hidroquinona. El EGDMA purificado se colocó en viales limpios, correctamente cerrados, para su posterior empleo.

II. 3 SÍNTESIS DE MONÓMERO ÁCIDO METACRILILOXI-O- BENZOICO (MAOB).

El método por el cual se sintetizó el monómero MAOB ha sido reportado previamente por Licea-Claverie, Rogel-Hernández, y Lopez- Sánchez en 2003. La reacción de síntesis se muestra en la **Figura 6**.

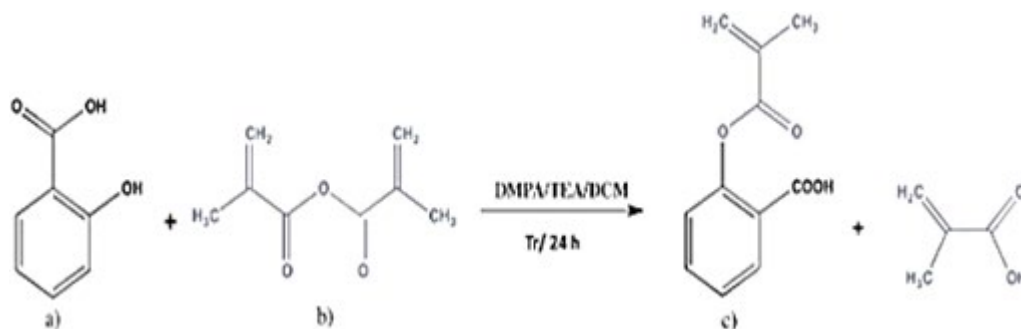


Figura 6. Ruta de síntesis de Ácido metacrililoxi-*o*-benzoico.

En un matraz bola de 100 mL se disolvieron 6.91 g de ácido salicílico y 0.49 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), en 8.42 mL de trietilamina y 20 mL de diclorometano. Se colocó la solución en un baño de hielo a 0 °C y se mantuvo con agitación constante, hasta disolver los reactivos sólidos. Posteriormente, se agregó gota a gota 7.50 g de anhídrido metacrílico (50 mmol), por un tiempo controlado de 3 horas, mediante el uso de una bomba de adición. La solución se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió la solución a un vaso de precipitado de 250 mL y se acidificó con ácido clorhídrico, hasta un pH=3.0, manteniendo la mezcla a 0 °C y con agitación constante. Se extrajo el precipitado obtenido por medio de éter etílico, utilizando un embudo de separación de 250 mL. Posteriormente, se lavó la fase orgánica con 20 mL de una dilución de ácido clorhídrico 0.1 M y 20 mL de agua destilada. La fase orgánica se secó utilizando

sulfato de magnesio anhidro se filtró a vacío y se colocó en un cristizador de vidrio hasta obtener un sólido seco. Este sólido, a su vez, se lavó con 30 mL de agua a temperatura ambiente y otros 30 mL a 40 °C, repitiendo tres veces de manera intercalada. Finalmente, se purificó el producto por medio de recristalización utilizando metanol y se dejó secar a 50°C en estufa con vacío.

II. 4 CARACTERIZACIÓN DE MAOB.

Antes de realizar la sal de MAOB, se realizó la caracterización del monómero MAOB, para identificarlo y asegurar que el material se encontraba en estado puro.

II. 4.1. Cromatografía de capa fina (CCF).

La pureza del producto fue evaluada por cromatografía de capa fina (TLC), con una mezcla de éter de petróleo / éter etílico (50:50).

Se prepararon dos soluciones, la primera solución (A), consistió en disolver 30 mg de ácido salicílico en 1 mL de metanol, dicha solución fue tomada como solución de referencia. Para la segunda solución (B), se colocaron 30 mg del monómero de MAOB previamente obtenido, y se disolvieron en 1 mL de metanol.

En una placa cromatográfica de aproximadamente 2 cm de ancho y 6 de largo, se trazó una línea inicial donde se colocó: en el punto A, 10 µL de la solución A, y en el punto B, 10 µL de la solución muestra, con una distancia de separación de 1 cm uno del otro. Posteriormente, se procedió a colocar cuidadosamente la placa en una cámara cromatográfica que contenía 5 mL de la mezcla de éter de petróleo / éter etílico (50:50). La placa fue retirada de la cámara cromatográfica después de que la mezcla recorrió alrededor del 85 % de la placa, se dejó secar y después se observó bajo luz ultravioleta, finalmente se midió el recorrido de cada una de las soluciones.

II. 4.2. Espectrofotometría de infrarrojo por transformada de Fourier, con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

El análisis de espectroscopia de infrarrojo se realizó con el equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR). Se limpió con metanol la superficie del diamante y se dejó secar. Posteriormente, se colocó una pequeña cantidad del producto en el diamante, se bajó la punta y, con ayuda del software, se leyó la muestra y se obtuvo el espectro IR.

II. 4.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN- H^1).

Se pesaron 25 mg de monómero de MAOB y se transfirieron a un tubo para RMN, posteriormente se agregaron 0.6 mL de cloroformo deuterado ($CDCl_3$) por medio de una pipeta de vidrio, para evitar algún tipo de contaminación. Se tapó el tubo, se agitó ligeramente hasta disuelto y se leyó en el equipo Spinsolve high de 60 MHz para obtener el espectro de RMN y así determinar los diferentes tipos de protones que existían en la molécula.

II. 5 GENERACIÓN DE SAL DE MAOB.

Se pesaron 0.9820 g de monómero de MAOB y 0.2669 g de hidróxido de potasio (KOH). Estos se transfirieron a sus respectivos vasos de precipitado que contenían 10 mL de metanol, cada uno. Las soluciones se colocaron en un baño de hielo a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvieron con agitación constante, hasta disolver los reactivos sólidos. Una vez disueltos, se agregó gota a gota la solución de KOH y metanol al vaso de precipitado que contenía la solución de MAOB. Posteriormente, se agregaron 40 mL de éter etílico y se dejó en refrigeración a $8\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h.

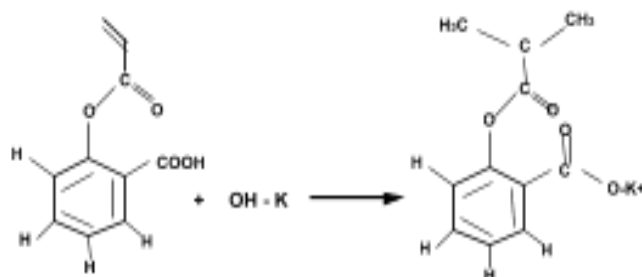


Figura 7. Ruta de síntesis de sal de MAOB.

Se precipitó la solución obtenida en 40 mL de éter etílico, esto con ayuda de agitación mecánica, posteriormente se filtró por medio de un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm y equipo de filtrado. Este paso se repitió hasta cubrir el total de la solución, utilizando aproximadamente 900 mL de éter etílico. El sólido filtrado se dejó secar a 50 $^{\circ}\text{C}$ por medio de una estufa con vacío.

II. 6 CARACTERIZACIÓN DE SAL DE MAOB.

La sal obtenida, al igual que el monómero, se caracterizó por medio del equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), como se menciona en el punto II. 4.2. para obtener el espectro IR.

II. 7 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS.

En un matraz bola de 50 mL, se agregaron 12.5 mL de agua destilada y 0.25 g de sal de MAOB. Se colocó en agitación y se adicionaron 12.5 mL más de agua destilada, posteriormente, se colocaron 10 μL de etilenglicol dimetacrilato (EDGMA) 5% molar como agente entrecruzante. La solución se colocó en atmósfera inerte por medio de burbujeo de gas nitrógeno, por 30 minutos, colocando un tapón antivuelco con septum al matraz para evitar entrada de oxígeno. Pasados los 30 minutos, se colocó en baño de aceite a 85 $^{\circ}\text{C}$. Se adicionaron 110 μL de persulfato de amonio (APS), 2% w/w el cual actúa como iniciador de la reacción de polimerización, y nuevamente se dejó en agitación por 40 minutos a 85 $^{\circ}\text{C}$. La solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que se tapó con papel parafilm y se colocó en un baño de hielo a 0 $^{\circ}\text{C}$.

II. 8 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

A las partículas obtenidas se les midió su tamaño, por medio del equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) ZetaSizer.

El producto obtenido a partir de la reacción de polimerización dio lugar a nanopartículas que quedaron inmersas en una solución líquida. De esta solución se tomó 1 mL, se colocó en una celda, para posteriormente realizar una primera lectura. Para la segunda lectura, se tomaron otros 1.5 mL de solución y se filtraron por medio de un filtro de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm , se colocaron en la celda previamente ambientada con agua bidestilada y se leyó en el equipo. Las lecturas se realizaron a 25 °C, es decir, la solución se dejó atemperando antes de su lectura. La solución restante se liofilizó.

II. 9 GENERACIÓN DE LIOFILIZADO DE NANOPARTÍCULAS.

El producto de la reacción obtenida para la síntesis de nanopartículas, fue liofilizado por medio del equipo liofilizador Labconco (freeze dry systema / freezone 4.5) , este se colocó a una temperatura de -50 °C por 3 días. El producto obtenido se colocó en viales de vidrio, limpios y secos, previamente pesados.

II.10 ESTUDIO DE HIDRÓLISIS – LIBERACIÓN.

Para este estudio se realizó la preparación de las siguientes soluciones amortiguadoras:

II.10.1 Solución de fluido gástrico simulado a pH 1.2: Se pesaron 2 g de NaCl y se disolvieron en un vaso de precipitado de 1 L que contenía 750 mL de agua destilada, se agregaron 7 mL de HCl concentrado. La solución se ajustó a pH, posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se llevó a volumen final con agua destilada.

II.10.2 Solución de fluido intestinal simulado a pH 6.8: Se pesaron 6.8 g de fosfato de potasio monobásico y se disolvieron en un vaso de precipitado de 1 L que contenía 500 mL de agua destilada, se agregaron 77 mL de una solución de NaOH

0.2 N. Esta solución se ajustó por medio de HCl 0.2 N o NaOH 0.2 N. La solución se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se llevó a volumen final con agua destilada.

II.10.3 Solución de fluido intestinal simulado a pH 7.4: Se pesaron 6.8 g de fosfato de potasio monobásico y se disolvieron en un vaso de precipitado de 1 L que contenía 250 mL de agua destilada, se agregaron 190 mL de una solución de NaOH 0.2 N y 500 mL de agua destilada. Esta solución se ajustó por medio de HCl 0.2 N o NaOH 0.2 N. La solución se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se llevó a volumen final con agua destilada.

Una vez obtenidas las soluciones, se utilizaron membranas de diálisis 12-14 kDa, en las cuales se colocaron 10 mg del liofilizado de nanopartículas con 10 mL de estas soluciones a pH fisiológico simulado, después las membranas, previamente selladas, se colocaron en vasos de precipitado de 60 mL que contenían 50 mL de medio. Los diferentes medios para utilizar fueron a pH 1.2, 6.8 y 7.4. Posteriormente, se pasó a colocar cada uno de los sistemas obtenidos a un oscilador VWE Shel Lab con condiciones de 37 °C y a 40 rpm. Para cada uno de los medios a diferentes pH's, se realizaron muestreos, tomando 1 mL del medio, a los 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 24 h. Cada una de las muestras tomadas se leyeron en un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 235 nm.

Nota. Después de tomar 1 mL de medio, se repuso ese mismo volumen con medio nuevo, previamente atemperado a 37 °C.

Anterior al estudio de hidrólisis - liberación, se realizó una curva de calibración para ácido salicílico, por medio de espectrofotometría UV-Vis, a longitud de onda de 236 nm, dicha curva se presenta en el anexo I.

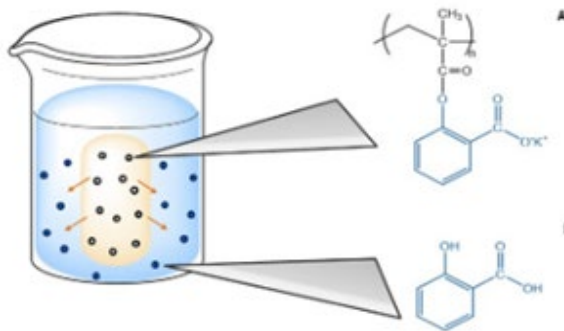


Figura 8. Representación de sistema de hidrólisis-liberación de ácido salicílico a partir de nanopartículas poliméricas. Poli(MAOb) en forma de sal (A) y ácido salicílico (B).

II. 11 EVALUACIÓN DE LIBERACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).

Se realizó una prueba de hidrólisis - liberación como se describe en el punto **II. 10**, esta vez solo en pH 6.8, se llevó a cabo por 6 horas y solo se tomó una muestra al finalizar este periodo de tiempo. Posteriormente, se colocaron 15 mL del medio y se le agregó gota a gota ácido clorhídrico concentrado, hasta llegar a pH 3.0. Se extrajo con cloroformo, por medio de un embudo de separación de 30 mL, se colocaron 30 mL de cloroformo y 10 mL del medio previamente acidificado. Se agitó vigorosamente el embudo y se liberó la presión cada vez que sometía a agitación, este paso se repitió tres veces. Una vez separada la fase acuosa de la orgánica, se procedió a desechar la fase acuosa y recuperar la fase orgánica, esta última se colocó en un vaso de precipitado y se dejó en una campana de extracción por 1 día, esto con el fin de que se evaporara el cloroformo.

Después de evaporar el cloroformo contenido en la fase orgánica, quedó una ligera capa color blanco (ácido salicílico), esta se resuspendió en 1 mL de metanol, finalmente este volumen se filtró por medio de un filtro de nylon de 0.45 μm y una jeringa de 1 mL, y se colocó en viales para HPLC. Finalmente, se leyó en el cromatógrafo de gases acoplado a masas.

II. 12 EVALUACIÓN DE LIBERACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Después de la realización de la prueba de hidrólisis - liberación (II.10), se tomó una muestra del medio a pH 6.8 la cual se analizó por medio de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

II. 12.1 Preparación de soluciones:

II.12.1.1 Fase móvil (solución buffer: acetonitrilo (70:30)):

- a) Solución buffer: se pesaron 1.6 g de 1-heptanosulfonato de sodio y se disolvieron en 300 mL de agua grado HPLC, esto se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL y se llevó a volumen con agua grado HPLC. Posteriormente, se ajustó el pH a 3.5 +/- 0.05 con ácido acético glacial. La solución obtenida se filtró y desgasificó utilizando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro. Se colocó en un reservorio limpio y seco.
- b) Solución de acetonitrilo: Se filtró y desgasificaron 500 mL de acetonitrilo grado HPLC, utilizando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro. Se colocó en un reservorio limpio y seco.

II.12.1.2 Solución diluyente: Se realizó una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (97:3), se desgasificó y filtró por medio de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro.

II.12.1.3 Solución de estándar de referencia de ácido salicílico a concentración nominal 32 μg / mL:

- a) Se pesaron aproximadamente 20 +/- 1 mg de estándar de ácido salicílico y se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL que

contenía 30 mL de solución diluyente, esto se agitó mecánicamente hasta disuelto y se aforó con solución diluyente.

b) Se colocó una alícuota de la solución anterior (a), se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con solución diluyente. La solución se agitó por 30 segundos y se filtró por medio de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y 13 mm de diámetro. La solución filtrada se colocó en un vial de 2 mL.

II.12.1.4 Solución muestra: Se tomó una porción de la solución obtenida en la prueba de hidrólisis - liberación a pH 6.8, se filtró por medio de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y 13 mm de diámetro. La solución filtrada se colocó en un vial de 2 mL.

II.12.2 Condiciones cromatográficas.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis.

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Columna | Hypersil Gold, Diamm 250 mm x 4.6 mm |
| Flujo | 1.2 mL / min |
| Tiempo de corrida | 5 minutos |
| Fase móvil isocrática | Acetonitrilo : Buffer (30 : 70) |
| Longitud de onda | UV a 280 nm |
| Temperatura de la columna | 45 °C |
| Volumen de inyección | 10 μL |

Se procedió a purgar las líneas del equipo y a acondicionar la columna, por alrededor de 30 minutos con las condiciones del método, y posteriormente se leyeron las muestras y capturaron los datos obtenidos.

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

III.1 SÍNTESIS DE MONÓMERO ÁCIDO METACRILILOXI-*O*- BENZOICO (MAOB).

Se obtuvo un polvo fino, color blanco, con un rendimiento del 98.58 %. Este se colocó en viales de vidrio con tapa, y se conservó en condiciones de baja humedad y a 25 °C de temperatura, para evitar su hidratación. El monómero obtenido se forma debido a una reacción de esterificación, que resulta de la unión de ácido salicílico con anhídrido metacrílico, por lo cual la estructura resultante estará compuesta de un ácido carboxílico en posición *orto* y un grupo éster en la posición *ipso* del anillo aromático. Esta reacción sucede en consecuencia de un ataque nucleofílico al carbonilo del anhídrido metacrílico, por parte del oxígeno del hidroxilo presente en el ácido salicílico, por lo tanto, se produce una sustitución nucleofílica acílica.

III.2 CARACTERIZACIÓN DE MAOB.

III.2.1 Cromatografía en capa fina.

Se logró observar, por medio de luz UV, la presencia de ácido salicílico, como se observa en la **Figura 9**. Del lado izquierdo se encuentra el estándar de referencia de ácido salicílico (A) y del lado derecho se encuentra la muestra de MAOB (B).

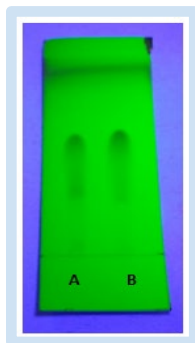


Figura 9. Cromatografía en capa fina.

El factor de retención se calculó y se obtuvo lo siguiente:

Rf = Distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación/ Distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.

$$\mathbf{Rf (A)} = (3.8 \text{ cm} / 4.2 \text{ cm}) = 0.90$$

$$\mathbf{Rf (B)} = (3.9 \text{ cm} / 4.2 \text{ cm}) = 0.92$$

El factor de retención obtenido, de 0.97 es muy cercano a 1 (valor ideal) por lo tanto, podemos decir que nuestra muestra es efectivamente similar a nuestro estándar de referencia. Es decir, de manera cualitativa, podemos ver que en nuestro monómero se encuentra presente ácido salicílico. Además, al utilizar una fase móvil de acetato de etilo y hexano, en una proporción 50:50, podemos observar un adecuado desplazamiento de esta en la fase estacionaria.

III.2.2 Espectrofotometría de infrarrojo por transformada de Fourier, con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

En el espectro de infrarrojo del monómero (**Figura 10**), se lograron observar bandas características de la molécula, los enlaces se describen en la **Tabla 2**:

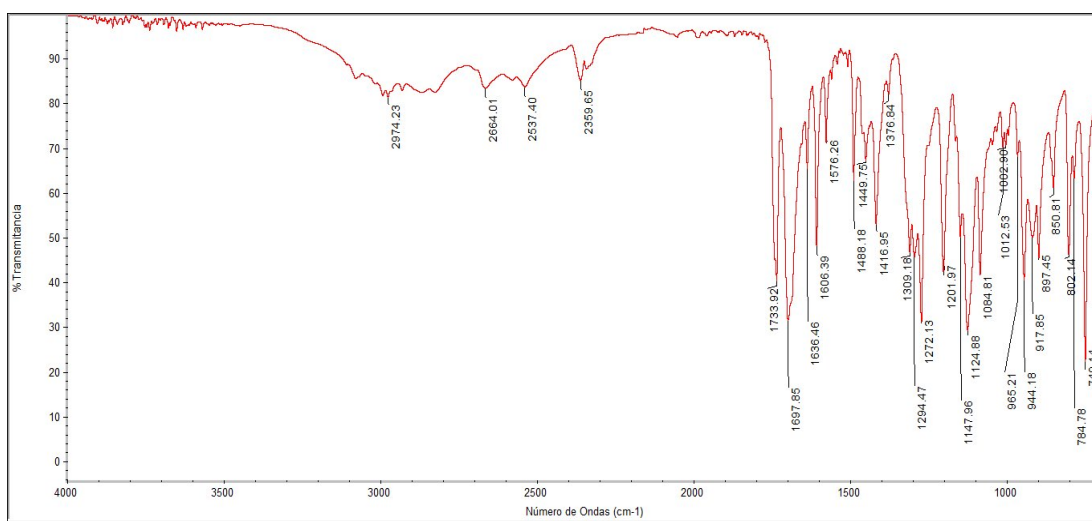
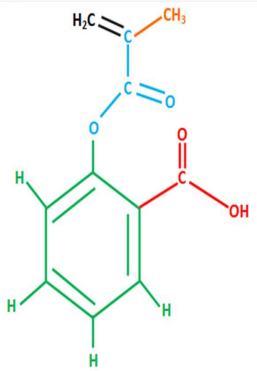


Figura 10. Espectro de infrarrojo del monómero de MAOB.

Tabla 2. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR de MAOB.

| Enlace | Número de onda (cm ⁻¹) | Grupo funcional | Molécula de MAOB |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------|---|
| C=O | 1697.85 | Ácido carboxílico |  |
| O-H | 2664.01 | Ácido carboxílico | |
| C=O | 1733.92 | Éster | |
| C=C | 1636.46 | Vinílico | |
| C-H | 2974.23 | Alifático | |
| C=C | 1606.39 | Aromático | |
| C-O | 1294.47 y 1012.53 | Unido al benceno (éster) | |
| Bandas de combinación | 1800-2200 | Aromático O-sustituído | |

Como se puede observar, el monómero sintetizado cuenta con las bandas características de los enlaces correspondientes a los grupos funcionales de nuestra molécula. Esto debido a que la molécula de MAOB cuenta con un anillo aromático, por lo que en el espectro podemos observar un conjunto de bandas entre 1800 cm⁻¹ y 2200 cm⁻¹, la flexión C-H oop, la encontramos a 749.12 cm⁻¹ y la tensión C-H a 2974.23 cm⁻¹; lo anterior debido a que el anillo se encuentra sustituido en la posición 1 y 2, por lo tanto, tiene una orientación *orto*. También cuenta con una parte ácida, por lo cual vemos que en el número de onda 1697.85 cm⁻¹, aparece una banda intensa, correspondiente al enlace carbonilo, y a 2664.01 cm⁻¹, se observa otra banda característica que corresponde al enlace O-H. Además, la molécula de MAOB se compone por un éster, por lo cual, podemos ver en el espectro una banda bien

definida a 1733.92 cm^{-1} , correspondiente al enlace C=O; también, se observa a 1636.46 cm^{-1} una banda correspondiente al enlace vinílico.

III.2.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^1H).

En el espectro de RMN- ^1H (**Figura 11**), podemos observar que existen 8 tipos de protones en nuestra molécula, lo cual, al comparar con nuestra molécula, podemos ver que son los tipos de protones que están presentes. El protón **a**, a un desplazamiento de 2.23 ppm. se observa un singlete que integra para 3 H, por lo cual pertenece a los hidrógenos del metilo; el protón **b**, a 5.93 ppm. que integra para 1 H, correspondiente al hidrógeno vinílico que se encuentra en posición cis con respecto al metilo; El protón **c**, un singlete que integra para 1 H, corresponde a otro de los hidrógenos vinílicos que se encuentra en posición trans con respecto al metilo, a 6.53 ppm.; Entre 7.25 ppm. y 8.20 ppm. existe una señal múltiple en 4 paquetes que integra para 4 H y pertenecen al anillo aromático (protón **d**, **f**, y **g**); finalmente, el protón **h**, a 9.45 ppm. hay un singlete ancho que integra para 1 H correspondiente al ácido carboxílico.

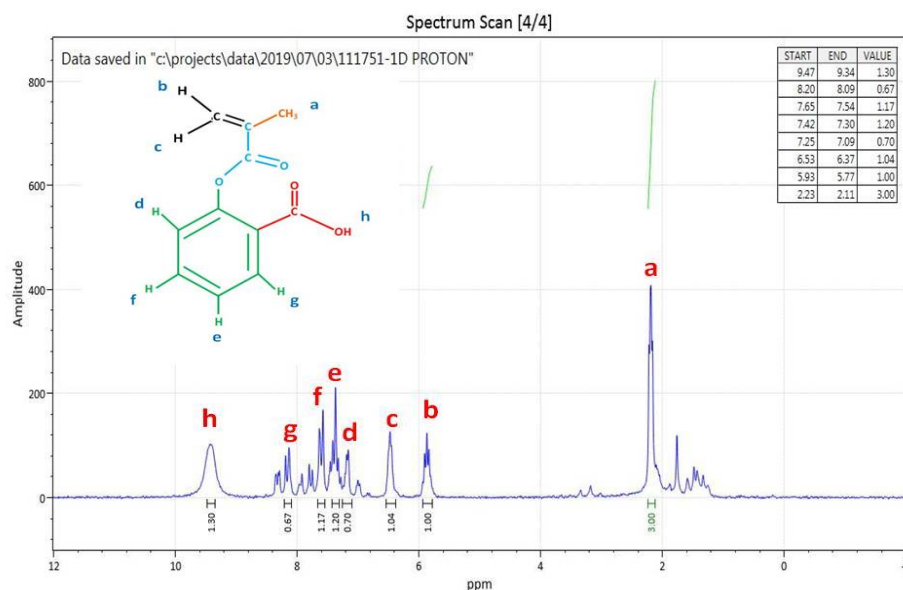


Figura 11. Espectro de RMN- ^1H del monómero de MAOB.

III.3 CARACTERIZACIÓN DE LA SAL DE MAOB.

III.3.1 Espectrofotometría de infrarrojo por transformada de Fourier, con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Se logró obtener un espectro de infrarrojo similar al obtenido anteriormente en el monómero, solo que ya no fue posible observar el enlace O-H que se encontraba en el ácido carboxílico, pues al ser una sal de potasio, el hidrógeno que se perdió en esta molécula fue sustituido por un ion de K^+ (**Figura 12**), la molécula y los enlaces químicos se encuentran en la **Tabla 3**. El resto de los enlaces de los diferentes grupos funcionales, permanecieron iguales.

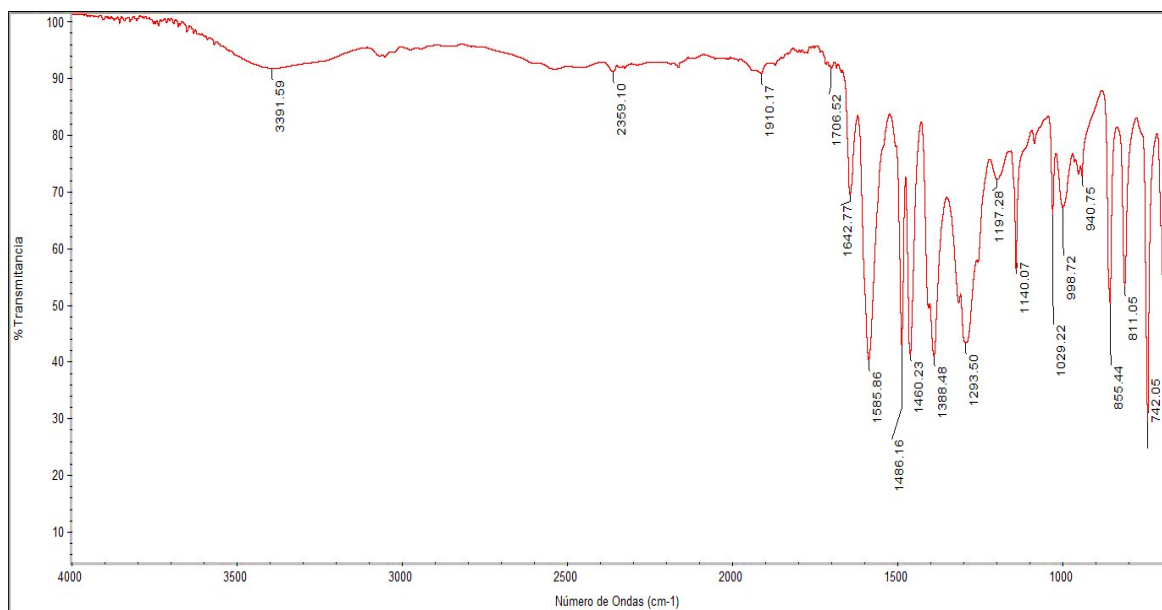


Figura 12. Espectro de infrarrojo de nanopartículas poliméricas de MAOB en forma de sal.

Tabla 3. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR de la sal de MAOB.

| Enlace | Número de onda (cm ⁻¹) | Grupo funcional | Molécula de sal de MAOB |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| C=O | 1585.86 | Carbonilo de éster 2 | |
| C-O·K ⁺ | 1642.77 | Éster 2 | |
| C=O | 1642.77 | Éster 1 | |
| C-H | 2359.10 | Alifático | |
| C=C | 1486.16 | Aromático | |
| C-O | 1293.50 y 998.72 | Unido al anillo | |
| Banda de combinación | 1700-2000 | Aromático O-sustituído | |

En el espectro IR obtenido, se puede observar que las nanopartículas dan como resultado bandas características de los enlaces correspondientes a los grupos funcionales de nuestra molécula. Pues esta, al igual que el monómero, cuenta con un anillo aromático, por lo que en el espectro podemos observar un conjunto de bandas entre 1700 cm⁻¹ y 2000 cm⁻¹, la flexión C-H oop, la encontramos a 742.05 cm⁻¹ y la tensión C-H a 2359.10 cm⁻¹; por lo que sabemos que el anillo tiene una orientación *orto*. Sin embargo, al realizar la reacción de polimerización hay dos cambios importantes en la estructura polimérica con diferencia a la del monómero. La primera diferencia es que el enlace vinílico (C=C) que se encuentra en el éster, en la estructura del monómero, desaparece al realizar la reacción de polimerización, por lo cual, en el espectrograma no veremos presente la banda característica de este enlace en la molécula de la sal de MAOB. La segunda diferencia es que, al formarse una sal,

desaparecerá la parte ácida para dar lugar a un éster, por lo cual la banda del enlace O-H del ácido carboxílico que estaba presente en el monómero, ya no estará presente en la estructura de las nanopartículas en forma de sal.

En cuanto al enlace carbonilo del éster que está en la posición 1, podemos ver una banda a 1642.77 cm^{-1} , lo cual hace referencia a este enlace. El enlace carbonilo del éster que se encuentra en la posición 2, o donde se encuentra la parte catiónica, podemos ver que su banda correspondiente está a 1585.86 cm^{-1} .

En la **Figura 13**, podemos observar una comparativa entre dos espectros IR, en el cual el espectro en color azul representa el monómero de MAOB y el espectro color negro representa las nanopartículas poliméricas en forma de sal potásica.

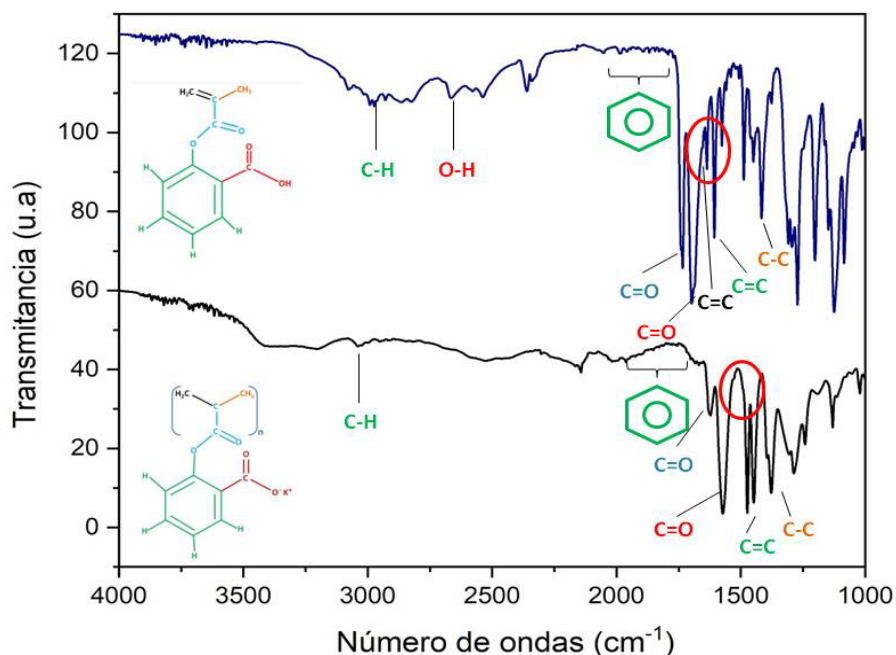


Figura 13. Espectro IR comparativo entre MAOB y nanopartículas poliméricas de MAOB en forma de sal.

III.4 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

III.4.1 Determinación de tamaño de partícula por medio de dispersión de luz dinámica (DLS).

De acuerdo con la técnica de DLS, se obtuvo una distribución de partícula uniforme, con un tamaño de 297.5 nm para la sal polimérica de MAOB, por lo cual se pudo confirmar que el sistema era nanométrico.

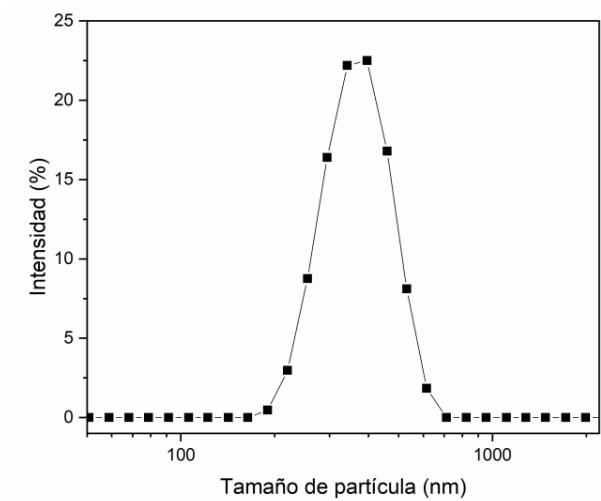


Figura 14. Distribución de tamaño de partícula.

III.5 ESTUDIO DE HIDRÓLISIS - LIBERACIÓN.

En los estudios de hidrólisis - liberación se observó que las nanopartículas liberan el fármaco ácido salicílico en los 3 pH's, pero hay una mayor liberación a menor tiempo a pH 1.2, pues de los 10 mg colocados, se lograron liberar 5.5 mg al cabo de 2 horas con 30 minutos. Sin embargo, en los pH's 6.8 y 7.4, la liberación se dio de manera similar, pero ligeramente por debajo de la de pH 1.2, como se observa en la **Figura 15** Para el estudio a pH 6.8 se obtuvo una liberación máxima a las 3 horas y media, liberándose 4.2 mg al medio. Y para el estudio a pH 7.4, se liberaron 4.3 mg a las 3 horas. El que se haya liberado mayor cantidad de

fármaco en el medio a pH 1.2, puede ser atribuido a que ocurre una ionización del polímero en forma de sal potásica en el medio de disolución a pH ácido.

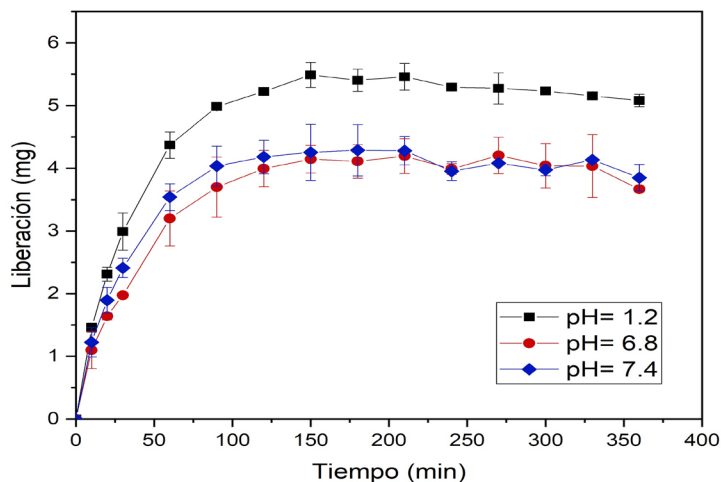
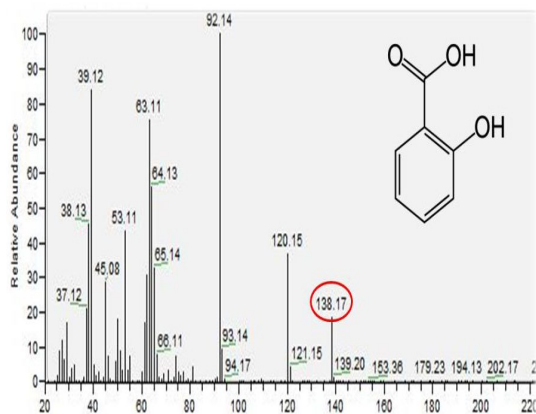


Figura 15. Hidrólisis - Liberación de ácido salicílico a partir de MAOB, por medio de nanopartículas poliméricas en forma de sal.

II.6 EVALUACIÓN DE LIBERACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).

Se obtuvo el espectro de las nanopartículas poliméricas de MAOB, el cual, de manera cualitativa, por medio de la espectrometría de masas se obtuvieron los iones que conformaban la molécula del ácido salicílico, así como su masa, obteniendo un ion molecular de 138.17 m/z, al comparar con la bibliografía (**Figura 16, inciso b**), se confirma la liberación de ácido salicílico ($C_7H_6O_3$) al medio.

a)



b)

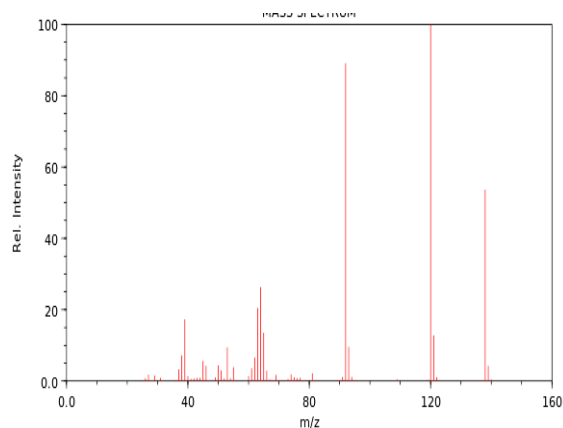
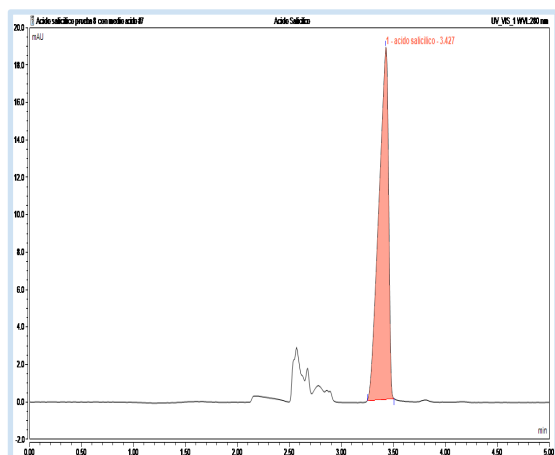


Figura 16. a) Espectro de masas de ácido salicílico obtenido a partir del medio de liberación. **b)** Espectro de referencia de ácido salicílico, obtenido de NIST Standard Reference Database 69: *NIST Chemistry WebBook*.²⁷

II. 7 EVALUACIÓN DE LIBERACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO POR MEDIO DE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Se obtuvieron los cromatogramas del estándar de referencia de ácido salicílico y de la muestra problema, es decir, de las nanopartículas poliméricas de MAOB. Observando que la respuesta del pico de la muestra coincide con la respuesta del pico del estándar de referencia, ya que el tiempo de retención del ácido salicílico es similar entre ambas muestras (**Figura 17**). Por lo cual podemos confirmar que efectivamente se liberó ácido salicílico al medio a partir de las nanopartículas sintetizadas.

a)



b)

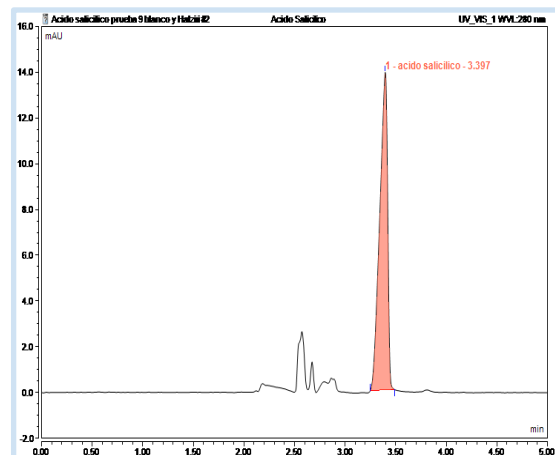


Figura 17. Cromatogramas de ácido salicílico a) estándar de referencia, b) muestra de nanopartículas poliméricas de MAOB.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar y purificar el monómero de MAOB, obteniendo un buen rendimiento de 98.6 %, esto gracias a una reacción de esterificación por sustitución nucleofílica acídica del ácido salicílico.
2. La correcta caracterización del monómero se logró por medio de las técnicas FTIR-ATR y RMN-¹H, obteniendo resultados satisfactorios, pues se encontraron las señales características del mismo en cada una de las técnicas. Con la técnica de FTIR-ATR se pudieron confirmar los grupos funcionales de la molécula y con la técnica de RMN-¹H se pudieron definir los diferentes tipos de protones de esta.
3. Se sintetizaron nanopartículas poliméricas a partir del monómero propuesto e igualmente se lograron caracterizar por medio de FTIR-ATR, obteniendo las bandas características principales de la molécula del polímero, por lo cual se pudo confirmar que se efectuó la reacción de polimerización.
4. Finalmente, se logró realizar el estudio de hidrólisis - liberación de ácido salicílico a partir de las nanopartículas poliméricas sintetizadas, esto realizado en 3 distintos medios con pH's fisiológicos simulados, para después cuantificarlo por medio de espectrofotometría UV-Vis, en la cual se demostró la sensibilidad a pH y temperatura en los 3 medios, habiendo una mayor liberación del fármaco a pH 1.2, esto debido a la ionización del polímero en forma de sal potásica en el medio ácido.
5. Los resultados obtenidos pueden ser de suma importancia en nanomedicina y el campo de nanopartículas, pues es bien sabido que cada vez tienen más impacto en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación que ayuden a superar las limitantes de los comúnmente usados. Al tener sistemas de suministro de nanofármacos a base de profármacos poliméricos, podemos proporcionar una administración dirigida a sitios específicos y lograr el efecto terapéutico deseado en el paciente, atravesar barreras fisiológicas especiales como la barrera hematoencefálica, evitar la liberación y degradación prematura del fármaco, así como su toxicidad.

6. Además, el ácido salicílico es ampliamente utilizado en diferentes patologías por sus grandes propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, analgésicas y antimicrobianas, y que mejor que poder combinarlo con un sistema nanométrico, logrando un efecto rápido, dirigido y sin deficiencias de dosificación, siendo cómo y eficaz para el paciente.

CAPÍTULO V. ANEXOS

Anexo 1. Curvas de calibración.

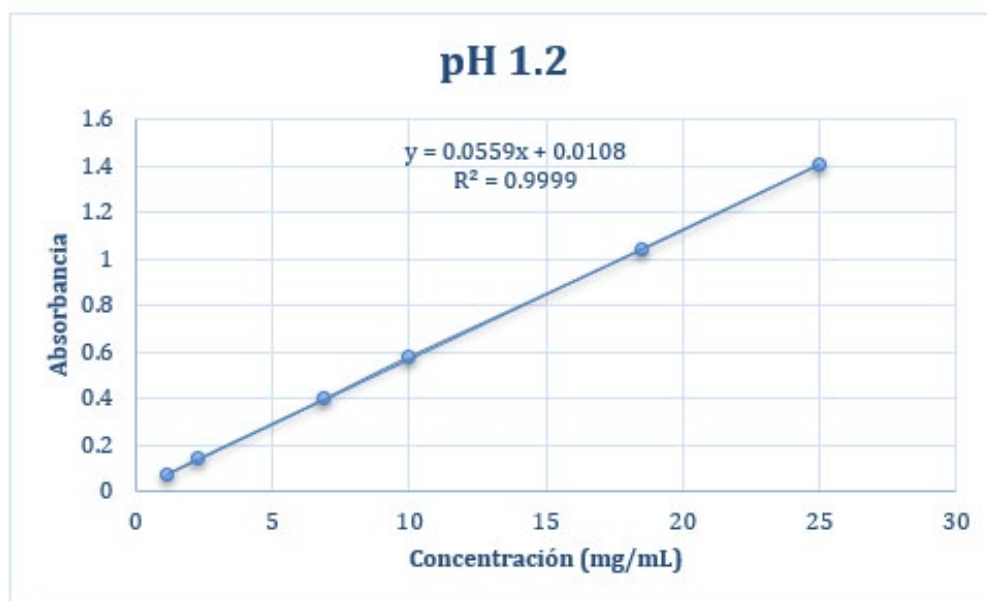


Figura 18. Curva de calibración a pH 1.2.

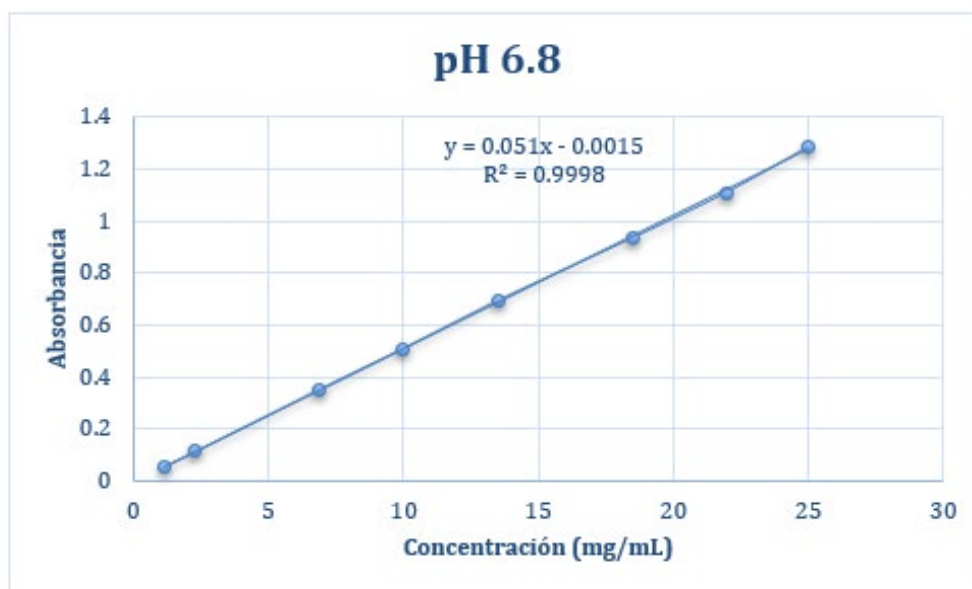


Figura 19. Curva de calibración a pH 6.8.

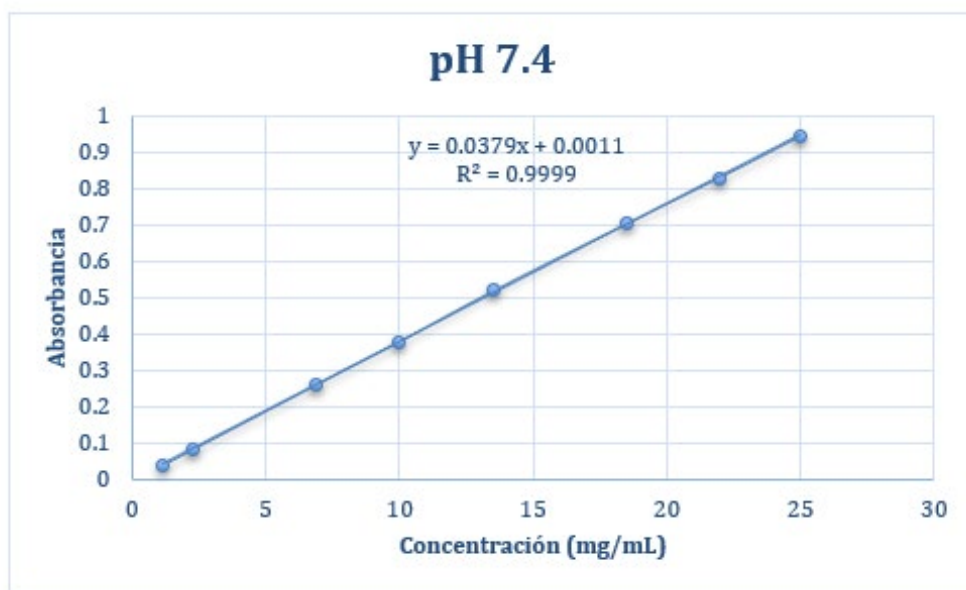


Figura 20. Curva de calibración a pH 7.4.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS

1. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (NCBI). Sistemas de administración de fármacos: administración localizada de fármacos de manera controlada. Octubre, 2016. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/sistemas-de-administraci%C3%B3n-de-f%C3%A1rmacos-administraci%C3%B3n-localizada-de#:~:text=administraci%C3%B3n%20de%20f%C3%A1rmacos%3F-%C2%BFQu%C3%A9%20son%20los%20sistemas%20de%20administraci%C3%B3n%20de%20f%C3%A1rmacos%3F,salud%20y%20alargar%20la%20vida.>
2. Rojas, Y., Aguado, K., González, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? Educación química (2006). 27, 286-291. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0187893X16300295?token=C25DCAF6B5A9B56BC08DB71C58F79CD8B93E49265B29CB656167C58DA1A45A8E296B66E6B6655D643117D206EAC6936B>
3. Mura, S., Nicolas, J., Counvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. Nature Material. (2013); 12(11):991-1003.
4. Yatvin, M., Weinstein, J., Dennis, W., Blumenthal, R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. Science. (1978). 202(4374):1290-1293.
5. Pan, X., Chen, J., Yang, M., Wu, J., He, G., Yin, Y., He, M., Xu, W., Xu, P., Cai, W., Zhang, F. Enzyme/pH dual-responsive polymer prodrug nanoparticles based on 10-hydroxycamptothecin-carboxymethylchitosan for enhanced drug stability and anticancer efficacy. Europea Polymer Journal. Vol. 117. Agosto, 2019. 372-382.
6. Magaña, H., Palomino, K., Cornejo-Bravo, JM., Díaz-Gómez, L., Concheiro, A., Zavala-Lagunes, E., et al. Polymeric prodrug–functionalized polypropylene films for sustained

- release of salicylic acid. *Int J Pharm* [Internet]. (2016). 511(1):579–85. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316306949>
7. Guillermo, M., Cort, R., Vallejo, B. M., Perilla, J.E., (2008) Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. 28(1), 57-71.
 8. Kastrissios, H., Suarez JR., Katzenstein, D. et al. Characterizing patterns of drug-taking behavior with a multiple drug regimen in an AIDS clinical trial. *AIDS* (1998); 12: 2295-2303.
 9. Eisen, SA., Miller, DK., Woodward, RS. et al. The effect of prescribed daily dose frequency on patient medication compliance. *Arch Intern Med.* (1990); 150: 1881-1884.
 10. Radovic-Moreno, A., Lu, T., Puscasu, V., Yoon, C., Langer, R., Farokhzad, O. Surface Charge-Switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS Nano.* (2012);6(5):4279-4287.
 11. Young, R., Lovell, P., *Introduction to Polymers.* 3a Edición. CRS Press. (2011). New York, EUA. Pág. 4.
 12. Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. (ECHA) Documento de orientación para monómeros y polímeros, versión 2.0. Abril, 2012. Disponible en: https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/polymers_es.pdf/3ad55eee-25ec-4a58-8f2b-064695340b7b
 13. Sandoval, C. *Petróleos mexicanos. Estireno: características.* (2015). Disponible en: <https://www.pemex.com/comercializacion/productos/Paginas/petroquimicos/estireno.aspx>
 14. Beltrán, M., Marcilla, A. *Tecnología de los polímeros: procesado y propiedades.* San Vicente del Raspeig: Universidad de Alicante, D.L.. (2012). Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=jxilUUn4_QAC&printsec=frontcover&dq=definicion+de+monomero+pdf&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiKj_CdsYHkAhWJwFQKHUWLBFsQ6AEIQjAE#v=onepage&q&f=false

15. Cardona, D., Lavernia, C., Alcerro, J. Acta ortopédica mexicana. Polietileno. (2010) 24(2):Mar-Abr. 123-128. <https://www.medigraphic.com/pdfs/ortope/or-2010/or102m.pdf>
16. Galego. (2018). Polymer Science in Havana University Resumen Introduction. 30(1), 77-89.
17. Jantas, R., Draczyński, Z., Herczyńska, L., Stawski, D. Poly(vinyl alcohol)-Salicylic Acid Conjugate: Synthesis and Characterization. Am J Polym Sci. 2012;2(5):79–84. Disponible en: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20120205.01.html>
18. Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K., Chouhan, R. S., Sadhu, V. (2019) Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*. (2019). 20, 100397. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>
19. 2. Kreuter, J., Speiser, P. In Vitro Studies of Poly(methyl Methacrylate) Adjuvants. Journal of Pharmaceutical Sciences. (1976). 65(11):1624-1627.
20. Jong, W., Borm, P., Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. International Journal of Nanomedicine. (2008). 3(2):133-149.
21. Lee, B., Yun, Y., Park, K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. Chemical Engineering Science. (2015). 125:158-164.
22. Kumar, B., Jalodia, K., Kumar, P., Gautam, H. K. Journal of Drug Delivery Science and Technology Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. J Drug Deliv Sci Technol [Internet]. (2017). 41:260–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.019>
23. Hermida, É. (2011). Guía didáctica: polímeros, capítulo 9 (pp. 14-15). Buenos Aires: INET.
24. Urrejola, M., Soto, L., Zumarán, C., Peñaloza, J., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., Haidar, Z. Sistemas de nanopartículas poliméricas II: Estructura, métodos de elaboración, características, propiedades, biofuncionalización y tecnologías de auto-ensamblaje capa por capa (layer-by-layer self-assembly). (2018). Int, J. Morphol., 36(4):1463-1471.

25. Bagul, R., Mahajan, V., Dhake, A. New approaches in nanoparticulate drug delivery system: a Review. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 4 (2012), pp. 29-38.
26. Jantas, R., Draczyński, Z., Herczyńska, L., Stawski, D. Poly(vinyl alcohol)-Salicylic Acid Conjugate: Synthesis and Characterization. *Am J Polym Sci.* (2012). 2(5):79–84. Disponible en: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20120205.01.html>
27. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. National Institute of Standards and Technology (NIST). Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook. (2018). Disponible en: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C69727&Mask=200>
28. Jeffreys, D. *Aspirin: the extraordinary story of a wonder drug.* (2010). New York: Bloomsbury. pp. 38-40.