



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

Síntesis de polímeros profármacos de tipo salicilato, su estudio de hidrólisis-liberación pH responsiva y evaluación biológica.

TESIS

**para obtener el título de
Maestría en Ciencias**

QFB. Hebrón Vázquez Estudillo

**Director:
Dr. Héctor Alfonso Magaña
Badilla**

**Co-director:
Dr. José Manuel Cornejo
Bravo**

Tijuana, B.C.

Noviembre de 2021

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

Folio No. 319
Tijuana, B.C., a 05 de octubre del 2021

C. Hebrón Vázquez Estudillo
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente.-

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

Es propuesto, por los C. Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y
Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema: "Síntesis de polímeros profármacos de tipo salicilato, su
estudio de hidrólisis-liberación pH responsiva y evaluación biológica",
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. MARCO TEÓRICO
- III. EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V. CONCLUSIÓN
- VII. BIBLIOGRAFÍA
- VIII. ANEXOS



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
TIJUANA

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director de Tesis

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora

Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director de Tesis

M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director Provisional

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
Índice.....	2
Lista de figuras.....	5
Lista de gráficas.....	8
Lista de tablas.....	9
Lista de anexos.....	10
Agradecimientos.....	11
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Resumen.....	16
1.2 Planteamiento del problema.....	17
1.3 Justificación.....	22
1.4 Hipótesis.....	24
1.5 Objetivo general.....	24
1.6 Objetivos específicos.....	24
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Polimerización vía radicales libres.....	27
2.2 Polímeros profármacos.....	29
2.3 Tipos de liberación de fármacos.....	30
2.4 Ácido salicílico (ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico) y sus propiedades.....	32
2.5 Propiedades del ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico y el ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico.....	35
2.6 Técnicas de caracterización.....	37
2.6.1 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	37
2.6.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ¹ H).....	38
2.6.3 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	40
2.6.4 Dispersión de luz dinámica y dispersión de luz estática.....	41
2.7 Pruebas biológicas.....	42
2.7.1 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en disco de Kirby-Bauer.....	42
2.7.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	43
2.7.3 Ensayo de MTT.....	45
3. EXPERIMENTAL	
3.1 Síntesis y purificación de monómeros.....	47
3.1.1 Síntesis de monómeros.....	47
3.1.2 Purificación de monómeros y evaluación de pureza.....	51
3.2 Síntesis y purificación de polímeros.....	52
3.2.1 Síntesis de polímeros.....	52
3.2.2 Purificación de polímeros y evaluación de pureza.....	53
3.3 Caracterización de materiales.....	54
3.3.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (FTIR-ATR).....	54
3.3.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ¹ H)	55
3.3.3 Determinación de peso molecular por dispersión dinámica de luz (DLS).....	57

3.3.4 Barridos por espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV/Vis).....	58
3.4 Estudio hidrólisis-liberación y detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS).....	59
3.4.1 Generación de comprimidos.....	59
3.4.2 Estudio hidrólisis-liberación.....	59
3.4.3 Método de análisis para cuantificación de ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico, ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico libre de los comprimidos por CLAR...	62
3.4.4 Detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)	65
3.5 Rectas de calibración por CLAR.....	66
3.5.1 Recta de ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico (AOH) en pH 7.4.....	66
3.6 Pruebas biológicas.....	67
3.6.1 Prueba de susceptibilidad por difusión en discos.....	67
3.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) en placa de 96 pocillos en <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
3.6.3 Ensayo de MTT para evaluación de citotoxicidad.....	71
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Síntesis y purificación de monómeros.....	76
4.1.1 Síntesis de monómeros.....	76
4.1.2 Purificación de monómeros y evaluación de pureza.....	78
4.2 Síntesis y purificación de polímeros.....	81
4.2.1 Síntesis de polímeros.....	81
4.2.2 Purificación de polímeros y evaluación de pureza.....	83
4.3 Caracterización de materiales.....	85
4.3.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (FTIR-ATR).....	85
4.3.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ¹ H)	89
4.3.3 Determinación de peso molecular por dispersión dinámica de luz (DLS).....	95
4.3.4 Barridos por espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV/Vis).....	97
4.4 Estudio hidrólisis-liberación y detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)	103
4.4.1 Generación de comprimidos.....	103
4.4.2 Estudio hidrólisis-liberación.....	103
4.4.3 Método de análisis para cuantificación de ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico, ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico libre de los comprimidos por CLAR...	116
4.4.4 Detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)	126
4.5 Rectas de calibración por CLAR.....	131
4.5.1 Recta de ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico (AOH) en pH 7.4	131
4.6 Pruebas biológicas.....	132
4.6.1 Prueba de susceptibilidad por difusión en discos.....	132
4.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) en placa de 96 pocillos en <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	135
4.6.3 Ensayo de MTT para evaluación de citotoxicidad.....	145

5. CONCLUSIONES..... 152

REFERENCIAS..... 155

ANEXOS..... 167

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntesis de polímero molecular de bloques LEGO y su despolimerización (Lu, Liu, & Zhou, 2018).
- Figura 2.** Polimerización por radicales libres (L. J. Wade, 2012).
- Figura 3.** Esquematación de un polímero profármaco de tipo 1 (Allen, 2002).
- Figura 4.** Comparación entre la concentración en sangre de un tratamiento convencional de dosis sucesivas contra un sistema ideal de dosificación controlada de la droga a través del tiempo de liberación (Pesquera, Serrano-Martín, Núñez, & China, 2019).
- Figura 5.** Descripción gráfica de el mecanismo de hidrólisis del ácido salicílico (AOH, ácido *o*-hidroxibenzoico) de las películas de PP-g-2MBA sintetizadas (Magaña et al., 2016).
- Figura 6.** Espectro de absorción IR de una película fina de poliestireno, se pueden apreciar los ejes y sus unidades además de las señales que presenta esta molécula al ser sometida a esta técnica de caracterización (Skoog, West, Holler, & Couch, 2005).
- Figura 7.** Espectro tradicional de RMN-¹H en el cual se muestra la amplitud de la señal contra partes por millón (ppm) (Parker et al., 2014).
- Figura 8.** Prueba de susceptibilidad por difusión en disco: Colocación aproximada de los discos y medición de los diámetros de las zonas de inhibición. ATB1 = antibiótico 1, ATB2 = antibiótico 2, etc (CDC & Ncird, n.d.).
- Figura 9.** Prueba de CMI y CMB (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition*, n.d.)
- Figura 10.** Interpretación de las pruebas de CMI y CMB (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition*, n.d.).
- Figura 11.** Se muestra la reacción general que ocurre en un ensayo de MTT, en la cual esta sal de tretazolio (amarillo, soluble en agua) se convierte enzimáticamente en formazán (púrpura, insoluble en agua) (Mosmann, 1983).
- Figura 12.** Reacción de síntesis para los monómeros b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB. (Licea-Claverie, A., Rogel-Hernández, E., López-Sanchez, J.A., Castillo-Arámbula, L.A., Cornejo-Bravo, 2003).
- Figura 13.** Reacción de síntesis para el g) poli(MAOB), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB) (Licea-Claverie, A., Rogel-Hernández, E., López-Sanchez, J.A., Castillo-Arámbula, L.A., Cornejo-Bravo, 2003).
- Figura 14.** Espectrómetro modelo Nicolet iS5 marca Thermo Scientific.
- Figura 15.** Espectrómetro Spinsolve® 60 marca Magritek con capacidad de núcleos ¹H, (© Magritek Ltd 2013 – 2015).
- Figura 16.** RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz.
- Figura 17.** Malvern Zetasizer Nano ZS.
- Figura 18.** Espectrofotómetro DR6000 marca Hach.
- Figura 19.** Prensa Carver y matriz de 13 mm de diámetro.
- Figura 20.** Oscilador VWR Shel Lab con temperatura controlada.
- Figura 21.** Cromatógrafo Ultimate 3000 de la marca Thermo Scientific.
- Figura 22.** Cromatógrafo de gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific modelo ISQ LT

- Figura 23.** Esquema general de las pruebas de CMI, se muestran la ubicación de los controles y diluciones en la placa, además de las concentraciones finales de cada pocillo después de las diluciones.
- Figura 24.** Esquema general de la ubicación de los controles y diluciones en la placa de 96 pocillos para la prueba de viabilidad celular, además de las concentraciones y proporciones de DMSO finales de cada pocillo después de las diluciones.
- Figura 25.** Fotómetro de microplaca Thermo Scientific™ Multiskan™ Modelo: 51119100.
- Figura 26.** Estructura química propuestas del b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB.
- Figura 27.** Apariencia física de los monómeros del b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB.
- Figura 28.** Estructura química propuestas del g) poli(MAOB), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB).
- Figura 29.** Apariencia física de los polímeros g) poli(MAOB), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB).
- Figura 30.** Espectro de FTIR del MAOB y el poli(MAOB) purificados.
- Figura 31.** Espectro de FTIR del MAMB y el poli(MAMB) purificados.
- Figura 32.** Espectro de FTIR del MAPB y el poli(MAPB) purificados.
- Figura 33.** Monómeros MAOB, MAMB y MAPB, con la señalización de todos sus protones.
- Figura 34.** Espectro de RMN del MAOB en el equipo de RMN Spinsolve high de 60 MHz.
- Figura 35.** Espectro de RMN del MAMB en el equipo de RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz.
- Figura 36.** Espectro de RMN del MAPB en el equipo de RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz.
- Figura 37.** Eje de simetría presente en los anillos *para*-sustituídos y en el monómero MAPB.
- Figura 38.** Estructuras químicas de el ácido *o*-hidroxibenzoico (AOH), el MAOB y el poli(MAOB).
- Figura 39.** Espectro de absorción en la región UV-Vis del ácido *o*-hidroxibenzoico (AOH), el MAOB y el poli(MAOB).
- Figura 40.** Estructuras químicas de el ácido *m*-hidroxibenzoico (AMH), el MAMB y el poli(MAMB).
- Figura 41.** Espectro de absorción en la región UV-Vis del ácido *m*-hidroxibenzoico (AMH), el MAMB y el poli(MAMB).
- Figura 42.** Estructuras químicas de el ácido *p*-hidroxibenzoico (APH), el MAPB y el poli(MAPB).
- Figura 43.** Espectro de absorción en la región UV-Vis del ácido *p*-hidroxibenzoico (APH), el MAPB y el poli(MAPB).
- Figura 44.** Espectro de absorción en la región UV-Vis de el MAOB, MAMB y el MAPB.
- Figura 45.** Espectro de absorción en la región UV-Vis de el poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB).
- Figura 46.** Mecanismo de hidrólisis sugerido para el poli(MAOB) en pH 1.2, que consiste en una catálisis ácida, se teoriza que el mecanismo de hidrólisis es igual para el poli(MAMB) y poli(MAPB), basándonos en las bajas, pero cercanas fracciones liberadas en este pH.
- Figura 47.** Mecanismo de hidrólisis sugerido para el poli(MAOB) en pH 6.8 y 7.4, que consiste en una catálisis nucleofílica intramolecular por el grupo carboxilo ionizado, mecanismo propuesto por Bender (Bender, 2002) para la hidrólisis de la aspirina en la zona independiente (entre pH 4 y 8) (Edwards, 1950).

- Figura 48.** Mecanismo de hidrólisis sugerido para el poli(MAMB) y poli(MAPB) en pH 6.8 y 7.4, que consiste en una catálisis básica general clásica del ataque del agua por el anión carboxilato (Fersht & Kirby, 2002).
- Figura 49.** Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAOB) con cepas de *E.coli* (izquierda) y antibiogramas de poli(MAMB) (centro) y poli(MAOB) (derecha) en *S. epidermidis* en agar Mueller Hinton.
- Figura 50.** Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAOB) arriba y poli(MAMB) y poli(MAPB) a la abajo en cepas de *C. albicans* sembradas en agar Mueller Hinton.
- Figura 51.** Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAMB) y poli(MAPB) en cepas de *E. coli* sembradas en agar Mueller Hinton
- Figura 52.** Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAMB) y poli(MAPB) en cepas de *S. aureus* sembradas en agar Mueller Hinton.
- Figura 53.** Interpretación de las pruebas de CMI en cepa de *S. aureus* (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).
- Figura 54.** Interpretación de las pruebas de CMI en cepa de *E. coli* (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).
- Figura 55.** Interpretación de las pruebas de CMI en cepa de *P. aeruginosa* (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).
- Figura 56.** Placa de 96 pocillos con la prueba de MTT de los polímeros poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h.
- Figura 57.** Placa de 96 pocillos con la prueba de MTT de los monómeros MAOB, MAMB y MAPB a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h.
- Figura 58.** Placa de 96 pocillos con la prueba de MTT de los principios activos AOH, AMH y APH a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h.

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Pesos moleculares promedio del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) con sus respectivas desviaciones estándar.
- Gráfica 2.** Liberación de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a pH 1.2 por CLAR.
- Gráfica 3.** Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a pH 6.8 por CLAR.
- Gráfica 4.** Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a pH 7.4 por CLAR.
- Gráfica 5.** Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAOB) a pH 1.2, 6.8 y 7.4 por CLAR.
- Gráfica 6.** Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAMB) a pH 1.2, 6.8 y 7.4 por CLAR.
- Gráfica 7.** Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAPB) a pH 1.2, 6.8 y 7.4 por CLAR.
- Gráfica 8.** Respuesta de crecimiento (%) de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAOB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.
- Gráfica 9.** Porcentaje de inhibición de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAOB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.
- Gráfica 10.** Respuesta de crecimiento (%) de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAMB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.
- Gráfica 11.** Porcentaje de inhibición de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAMB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.
- Gráfica 12.** Respuesta de crecimiento (%) de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAPB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.
- Gráfica 13.** Porcentaje de inhibición de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAPB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.
- Gráfica 14.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 en presencia de los polímeros poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h (* indica una disminución significativa del control DMSO 1%, $p < 0.05$).
- Gráfica 15.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 en presencia de los monómeros MAOB, MAMB y MAPB a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h (* indica una disminución significativa del control DMSO 1%, $p < 0.05$).
- Gráfica 16.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 en presencia de los principios activos AOH, AMH y APH a varias concentraciones (de 0.125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h (* indica una disminución significativa del control DMSO 1%, $p < 0.05$).

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Estructura del AS (ácido *o*-hidroxibenzóico) y algunos datos destacados de este fármaco (National Center for Biotechnology Information, 2021. PubChem Compound Summary for CID 338, Salicylic acid.) *(Tetko, 2005).
- Tabla 2.** Estructura del APH (ácido *p*-hidroxibenzóico) y algunos datos destacados de esta molécula (Billardello & Berthod, 2002; Goto et al., 2011, National Center for Biotechnology Information, 2021. PubChem Compound Summary for CID 135, 4-Hydroxybenzoic acid.) *(Tetko, 2005).
- Tabla 3.** Estructura del AMH (ácido *m*-hidroxibenzóico) y algunos datos destacados de esta molécula (Goto et al., 2011, National Center for Biotechnology Information, 2021. PubChem Compound Summary for CID 7420, 3-Hydroxybenzoic acid.) *(Tetko, 2005).
- Tabla 4.** Reactivos, solventes y gases empleados en este proyecto.
- Tabla 5.** Concentraciones para la preparación de recta de calibración: AOH pH 7.4 mediante CLAR.
- Tabla 6.** Porcentajes de rendimiento del MAOB, MAMB y MAPB.
- Tabla 7.** Factores de retención obtenidos de las TLC del MAOB, MAMB y MAPB antes de ser purificados.
- Tabla 8.** Factores de retención obtenidos de las TLC del MAOB, MAMB y MAPB después de ser purificados.
- Tabla 9.** Porcentajes de rendimiento del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB).
- Tabla 10.** Factores de retención obtenidos de las TLC del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) antes de ser purificados.
- Tabla 11.** Factores de retención obtenidos de las TLC del poli(MAOB) purificado, AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), poli(MAPB) purificado y el APH (ácido *p*-hidroxibenzóico).
- Tabla 12.** Pesos moleculares promedio del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB), Dalton (Da) y g/mol son numéricamente equivalentes, por lo que los PM son los mismos en las unidades convencionales de g/mol.
- Tabla 13.** Modelos cinéticos y valores de las constantes de velocidad de los polímeros a diferentes pH.
- Tabla 14.** Cromatogramas del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y el APH (ácido *p*-hidroxibenzóico) a pH 1.2 con el método de cuantificación por CLAR.
- Tabla 15.** Cromatogramas del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y el APH (ácido *p*-hidroxibenzóico) a pH 6.8 con el método de cuantificación por CLAR.
- Tabla 16.** Cromatogramas del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y el APH (ácido *p*-hidroxibenzóico) a pH 7.4 con el método de cuantificación por CLAR.
- Tabla 17.** Cromatogramas y espectros de masas de liberaciones a pH 7.4 del poli(MAOB) siendo su producto de hidrólisis el AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), del poli(MAMB) siendo su producto de hidrólisis el AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y del poli(MAPB) siendo su producto de hidrólisis el el APH (ácido *p*-hidroxibenzóico) mediante GC/MS.
- Tabla 18.** Diámetros de los halos de inhibición antibiogramas del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) en cepas de *C. albicans* sembradas en agar Mueller Hinton.

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** TLC de los monómeros b) MAOB (o), d) MAMB (m) y f) MAPB (p) antes de ser purificados.
- Anexo 2.** TLC de los monómeros b) MAOB (o), d) MAMB (m) y f) MAPB (p) después de ser purificados.
- Anexo 3.** TLC de los monómeros b) MAOB (izq, M), d) MAMB (centro, M) y f) MAPB purificados y sus respectivos polímeros, g) poli(MAOB) (izq, P), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB) (centro, P) antes de ser purificados.
- Anexo 4.** Curvas de calibración del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico) en pH fisiológicos por CLAR a 280 nm.
- Anexo 5.** Curvas de calibración del AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) en pH fisiológicos por CLAR a 288 nm.
- Anexo 6.** Curvas de calibración del APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) en pH fisiológicos por CLAR a 245 nm.
- Anexo 7.** Pruebas de rango múltiple de poli(MAOB) en prueba de MTT.
- Anexo 8.** Pruebas de rango múltiple de poli(MAMB) en prueba de MTT.
- Anexo 9.** Pruebas de rango múltiple de poli(MAPB) en prueba de MTT.
- Anexo 10.** Pruebas de rango múltiple de MAOB en prueba de MTT.
- Anexo 11.** Pruebas de rango múltiple de MAMB en prueba de MTT.
- Anexo 12.** Pruebas de rango múltiple de MAPB en prueba de MTT.
- Anexo 13.** Pruebas de rango múltiple de AOB en prueba de MTT.
- Anexo 14.** Pruebas de rango múltiple de AMB en prueba de MTT.
- Anexo 15.** Pruebas de rango múltiple de APB en prueba de MTT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California, a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías por el uso de sus instalaciones, y a los profesores que me acompañaron en esta etapa académica, el haberme permitido desenvolverme, aprender y culminar mi posgrado, después de estos dos años mi maestría.

Agradezco a la beca CONACYT, con clave 2019-000037-02NACF-18668, ya que gracias a este apoyo fue posible la realización de este proyecto, me dio la oportunidad de enfocarme en mi proyecto y lograr buena cantidad de avances desde los primeros meses de mi maestría, de igual manera fue de gran ayuda durante los meses de pandemia.

Agradezco a el Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y a la Dra. Kenia Palomino, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por abrirme las puertas al laboratorio de Biofarmacia desde la realización de mi tesis de licenciatura hasta la culminación de mi maestría. Por confiar en mi y en mi potencial como alumno y profesionista. Al Dr. lo admiro y respeto porque desde que lo conozco siempre ha trabajado arduamente, siempre está de arriba para abajo, sacando adelante proyectos, congresos, clases, laboratorios y los desafíos que le pongan enfrente. Por eso hoy puede decir que no podría estar finalizando este posgrado sin su apoyo. A la Dra. Palomino, le agradezco por todo el tiempo que invirtió en apoyarme y que gracias a ella se pudo llevar a cabo toda la preparación y culminación de las pruebas biológicas de citotoxicidad, a pesar de no entrar dentro de sus responsabilidades; por los días que tuvo que llegar tarde a su casa porque trabajábamos hasta tarde, por el apoyo y las buenas pláticas; estaré siempre muy agradecido por todo lo que han hecho por mí. Desde que los conozco siempre le han tenido mucho cariño a la facultad, a la universidad y a su profesión, es para mí importante destacarlo y darles mi entero reconocimiento.

Quiero agradecer también a mi ex tutor académico y co-director de tesis, Dr. José Manuel Cornejo Bravo y a la Dra. Aracely Serrano Medina, por el acceso al laboratorio y el uso del equipo y material del laboratorio de Biofarmacia, por abrirme las puertas de su casa y su amistad.

Agradezco al laboratorio de Biofarmacia y a todos sus integrantes por su compañía. A Ángel y Hatziri, fueron meses de trabajo, bromas, salidas y hasta congresos en la licenciatura y coincidimos en algunos meses ahora en el posgrado. Agradezco su compañía y su ayuda, ya que con ustedes siempre tuve en quien apoyarme cuando lo necesité. A Teresa, Paula y Alondra, fueron buenas pláticas y fueron de gran apoyo cuando necesitaba solucionar dudas, agradezco su tiempo y su interés.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Estaré toda mi vida agradecido con mis padres y mi familia; con mis padres por haberme criado y haberme convertido en quien soy. Por darme lo que tengo, por motivarme cada día a mejorar y seguir el camino que es correcto. Los amo con todo mi ser, nada de lo que he logrado a sido sólo esfuerzo mío, siempre compartiré los créditos con ustedes por ser mi motor y mi guía.

Mi eterno agradecimiento es para ti papá, que gracias a Dios y a la vida te puso a ti para enseñarme lo que es correcto. A ti que con mucho esfuerzo nos sacaste adelante. A ti que siempre nos has puesto por encima de tus necesidades. Por ti es que he logrado tanto, por tu apoyo, por tus palabras de animo y por las altas expectativas que tienes de mí. No hubo día en que no me alegrara cuando me decías que estabas orgulloso de mí por como me iba en la escuela, eso me motivó y me sigue motivando aún más y si a alguien puedo adjudicarle todo lo que he obtenido, es a ti, puedo decir que lograste tu meta conmigo también, escribí esto siendo mis últimos días como estudiante de licenciatura y lo retomo ahora que culmino mi posgrado, y es que lo sigo pensando y expresando de la misma manera, es por ti que lo logré, te amo inmensamente.

A mi hermana menor, agradezco tu compañía, tus palabras de animo, tu interés y por todas las veces que estuviste ahí para mí. A mi hermana mayor, gracias por todo el apoyo logístico, muchos de mis trabajos salieron adelante gracias a tu imaginación y disponibilidad, a las dos gracias por aguantarme tanto en estos años de carrera, por recibir a mis compañeros en la casa y por apoyarme siempre que lo necesite, son lo mejor que me ha pasado en la vida y espero les gusten las palabras que escribí para ustedes. Mi eterno amor y cariño, para ustedes familia.

A Brisa y Jocelyn, agradezco su compañía estos dos años, ha sido un gusto enorme coincidir y conocerlas en esta etapa de mi vida, hubo estrés, preocupaciones, sustos, pero las risas, la comida y por ahí algunas “reuniones pequeñas y tranquilas” nunca faltaron, me quedo con muchos excelentes recuerdos y lecciones, las aprecio mucho y espero seguir las viendo con el paso de los años.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a todos mis amigos, que me han acompañado desde hace tantos años y estuvieron para mí ahora durante mi posgrado, a Alejandra y Arturo, por las palabras de ánimo y las salidas para liberar estrés. A Jesús, Alex, José, Keyla y Axis por siempre estar al pendiente con la pregunta “¿cómo va la maestría?” a mitad de “las reuniones pequeñas y tranquilas”, han sido muy importantes para mí, todos esos momentos y los llevaré toda la vida conmigo.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la dirección de los profesores-investigadores:

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla.

Y

Dr. José Manuel Cornejo Bravo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Resumen

En el presente trabajo se desarrollaron comprimidos a partir de tres diferentes polímeros profármacos de tipo salicilato, de tipo estímulo sensible al pH, esto les permitió prolongar la liberación de principios con efectos terapéuticos de analgésicos-antiinflamatorio, de igual manera se estudió la inhibición bacteriana de estos polímeros y su citotoxicidad. Se busca que tentativamente fueran formas farmacéuticas por vía oral, a pesar de ello, este estudio servirá de base para la futura formulación de hidrogeles para vía tópica (con fines de profilácticos ante quemaduras o daños en piel) o el injerto de estos polímeros a dispositivos médicos, con el fin de reducir su colonización por bacterias además de la liberación de un analgésicos-antiinflamatorio. Este tipo de sistemas continúan siendo un reto en el área de la tecnología farmacéutica; por lo cual el diseño de sistemas inteligentes o sensibles a factores externos como el pH, calor o luz ha tenido un gran auge en los últimos años (Palena, García, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2015).

Lo comentado previamente se inició mediante la síntesis de los monómeros ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB), ácido metacriloiloxi-*m*-benzoico (MAMB) y el ácido metacriloiloxi-*p*-benzoico (MAPB), con sus respectivos polímeros poli(MAOB), poli(MAMB), poli(MAPB) y su respectiva caracterización por medio de espectroscopia de FTIR-ATR, RMN-¹H y DLS. Posterior a esto la generación de comprimidos y el estudio del proceso de hidrólisis en condiciones fisiológicas simulada, para observar la cinética de hidrólisis-liberación del ácido *o*-hidroxibenzoico, *m*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzoico por cromatografía de CLAR y Gases-Masas a pH = 1.2, 6.8 y 7.4.

El paso final consistió en la evaluación de sus efectos antimicrobianos en *S. aureus*, *E.coli* y *P. aeruginosa* y finalmente determinación de citotoxicidad, para ello se evaluó la viabilidad celular en cultivos celulares de fibroblastos de ratón BALB/3T3

1.2 Planteamiento del problema

Actualmente la investigación químico-farmacéutica se centra en búsqueda de nuevas moléculas con actividad terapéutica y a su vez en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos. Estos últimos son de gran interés ya que es posible mediar la sesión o liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica por estímulos externos como son el pH y/o temperatura. Sistemas de liberación controlada de fármacos estímulo sensibles cada vez son de mayor relevancia para actividades biomédicas, especialmente para prevenir procesos de colonización bacteriana, dolor e inflamación, al cual tiende a experimentar un paciente después de un procedimiento médico-quirúrgico. Por lo cual contar con sistemas de liberación controlada para estas aplicaciones y bajo estas características, es de gran relevancia actualmente. Algunos ejemplos de alto interés para la biomedicina, es el desarrollo de dispositivos médicos con estas características, por ejemplo, con catéteres, sondas médicas, hilos de sutura, etc.

Existen reportados en diversos artículos el uso de polímeros profármacos injertados a dispositivos médicos, como es el caso de Melendez-Ortiz et al., 2014 que trabajaron con películas de polipropileno “(PP-g-DMAEMA)-g-NIPAAm”, las cuales fueron funcionalizadas con polímeros sensibles a estímulos mediante radiación gamma para albergar antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Lograron crear superficies con capacidad para interactuar iónicamente con diclofenaco o ibuprofeno, una carga de diclofenaco más eficiente que la de ibuprofeno y demostraron que los injertos binarios son capaces de proporcionar una liberación sostenida y son adecuados para

obtener dispositivos médicos liberadores de fármacos hemo- y citocompatibles que pueden albergar y controlar la liberación de cantidades importantes de AINE (Melendez-Ortiz, 2014).

En el trabajo realizado por (Magaña et al., 2016), se sintetizaron películas de PP-g-2MBA, estas al igual que se espera en este trabajo, mostraron una cinética de liberación dependiente del pH. Por lo que la velocidad de liberación del profármaco esta mediada por la sensibilidad al pH de la hidrólisis de enlace éster. Esperan que dispositivos médicos con 20% de injerto proporcionen una liberación controlada de ácido salicílico durante un periodo de varios días en el área en que se implanten sin afectar la viabilidad celular. Su técnica de injerto permite un control preciso de la cantidad de fármaco incorporado en el dispositivo y puede adaptarse a los requisitos del sitio de implantación.

A su vez también el desarrollo de sistema de liberación controlada para quemaduras es de gran interés, debido a que en la actualidad las quemaduras y daños a la piel constituyen una de las lesiones traumáticas más importantes referente a la salud de una persona, debido a las alteraciones fisiopatológicas que ocurren en el organismo, el dolor, complejidad y falta de éxito del tratamiento, tiempo prolongado de curación, además de los riesgos de contraer infecciones que estas implican (Campos, 2002). Al sufrir una quemadura, el área de la lesión es estéril; pero con el paso de las horas se va colonizando por los microorganismos que se encuentre en nuestra piel y otras partes de nuestro cuerpo. También pueden ser adquiridas en el ambiente hospitalario o de manos del personal de salud y entre los microorganismos multi-resistentes que pueden invadir estas lesiones se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de enterobacterias como *Escherichia coli* son los microorganismos más identificados (Burns., 2015; Hassen A F, Khalifa S B, 2014; Öncül O, Öksüz S, Acar A, Ülkür E, Turhan V, Uygur F, 2014).

Un estudio realizado por el Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca” mostró que la incidencia de bacteriemia por quemaduras en niños fue de 9,6 eventos por 1.000 días paciente. Las bacterias más frecuentes aisladas fueron enterobacterias (41,9%), *Staphylococcus aureus* (22,6%) y *Pseudomonas aeruginosa* (22,6%). Los pacientes con quemaduras $\geq 20\%$ SCQ y de segundo grado profundo o mayores con dos o menos desbridamientos presentan mayor riesgo de bacteriemia (Teresa de J. Chávez-Velarde, Juan C. Lona-Reyes, 2017). Otro estudio por parte del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ, Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra»); evaluó durante los 36 meses, 491 pacientes de ingreso por primera vez, se excluyeron 78 por tener indicios de otro tipo de infección diferente a la de torrente sanguíneo. Se incluyó un total de 413 pacientes distribuidos temporalmente de la siguiente forma: 129 en 2013, 163 en 2014 y 121 en 2015. Durante el tiempo de hospitalización 32 pacientes (7.7%) desarrollaron infección del torrente sanguíneo. Fueron identificados 65 microorganismos en total; siendo *Pseudomonas aeruginosa* el microorganismo que se aisló con mayor frecuencia en un 53% (17 casos), seguido de *A. baumannii*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae* (Colín-castro, Chávez-heres, Magaña, & Franco-cendejas, 2017).

Suponen un gran reto para el tratamiento del paciente quemado, por lo que es importante contar con sistemas pH dependientes que controlen adecuadamente la liberación de analgesicos, antiinflamatorios y moléculas de inhibición bacteriana que mantengan concentraciones en el rango efectivo, no tóxico (Sáez V., Hernández E., 2004) y que eviten la colonización de la herida o quemadura, evitando así infecciones en el área.

Una propuesta importantes del campo de la tecnología farmacéutica es el uso de hidrogeles a partir de polímeros profármacos. Los hidrogeles son ideales cuando la piel está intacta y no han aparecido ampollas o son muy pequeñas y a las que presentan ampollas, pero se les ha extraído el líquido.

Se produce rápidamente sensación de frescura y alivio más aún si ha sido conservado en frío, reducen el dolor y la inflamación considerablemente. Otra propiedad importante en su aplicación, es que evitan la contaminación, dando frío local ya que generalmente los microorganismos se desarrollan a temperaturas más elevadas, hidrata, refresca y aísla, creando un ambiente húmedo (Gallardo Gonzalez, R.; Ruiz Pamos, J.G. ; Torres Palomares, R.M.; Diaz Oller, 2000).

Otra gran problemática importante referente a la salud de una persona relacionada con los riesgos de contraer infecciones en el ambiente hospitalario o de manos del personal de salud, son las bacteriemias relacionadas con el uso de catéteres intravasculares, ya que en muchos de los casos, son necesarios para la monitorización y tratamiento de pacientes en estado crítico (Lona-Reyes et al., 2016). Entre los microorganismos que pueden invadir los catéteres intravasculares, se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies de enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* son los microorganismos más identificados (Céspedes Rodríguez, Camacho Blanco, Rodríguez Bencomo, & Rivero, 2006). En el estudio de Céspedes Rodríguez et al., se realizó un estudio acerca de las complicaciones infecciosas por el uso de catéteres venosos centrales, en el Hospital Pediátrico Universitario de Camaguey “Dr. Eduardo Agramante Piña” en Cuba, desde enero de 1998 a diciembre de 2004. Estuvo constituido por 291 pacientes ingresados en las unidades de atención al paciente pediátrico grave, a los que fue necesario insertar un catéter venoso. La selección de la muestra se realizó mediante muestreo aleatorio simple ($n = 65$), de las cuales, los microorganismos más frecuentemente aislados fueron las bacterias del grupo de las enterobacterias, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Klebsiella spp* resultó ser el germen más frecuentemente aislado independientemente del sitio anatómico de inserción del catéter, seguido de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Céspedes Rodríguez et al., 2006). En otros

estudios con una muestra más grande (n = 204), se tuvo como microorganismo más frecuentemente aislado a *Staphylococcus epidermidis* (Lona-Reyes et al., 2016). Finalmente en el caso de las infecciones relacionadas a los catéteres utilizados tanto para hemodiálisis como para diálisis peritoneal (DP), los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Staphylococcus aureus* en pacientes en hemodiálisis, mientras que en pacientes en DP, fueron *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (María Carmen Fariñas, José Daniel García-Palomo, & Manuel Gutiérrez-Cuadra, 2008). Algunas propuestas que da María Carmen Fariñas et al., para evitar las infecciones de los catéteres venosos centrales (CVC), son la mejoría de las condiciones higiénicas en la inserción de los catéteres, el tratamiento de los portadores nasales de *S. aureus*, el tratamiento regular del orificio de salida de los catéteres y el sellado del catéter, ya que se han asociado con una disminución en las infecciones asociadas a catéter en pacientes en hemodiálisis y DP.

Se sabe, que los fármacos antipiréticos, en este caso el ácido salicílico también tiene efectos antimicrobianos directos e indirectos (Zimmermann & Curtis, 2017) de los cuales hablaremos más adelante. La interrogante radica en si los ácidos *m*- y *p*-hidroxibenzóicos, poseerán las propiedades terapéuticas de su homólogo el ácido *o*-hidroxibenzóico, los cuales podrían darle solución a una parte de estos problemas de salud mundial.

Por ello, con este proyecto se pretende sentar las bases para poder llevar a cabo en un futuro la formulación de estos hidrogeles o el injerto de los polímeros en dispositivos médicos como el caso de los catéteres. Este proyecto evaluó los efectos biológicos que poseen los principios activos ácido *o*-hidroxibenzoico, *m*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzoico y sus respectivos polímeros poli(MAOB), poli(MAMB), poli(MAPB). Además de sus propiedades fisicoquímicas individuales y la caracterización de cada sistema, ya que todos estos datos permitirán darle más relevancia y mostrará que tan prometedores podrían llegar a ser estos hidrogeles o estos dispositivos médicos

injertados de diseñarse en un futuro. Se espera que estas formas farmacéutica mantengan las concentraciones del fármaco en el rango efectivo y no tóxico, además de una liberación prolongada.

1.3 Justificación

Debido a la necesidad de contar mayores herramientas para contrarrestar problemas infecciosos, dolorosos e inflamatorios en aplicaciones biomédicas, el uso de polímeros profármacos con características a los mencionados flancos terapéuticos, tiende hacer una propuesta interesante, aunado a que se puede tener una sesión o liberación controlada del fármaco de forma sostenida.

En 2010, fue realizada la síntesis de un polímero profármaco de ketoprofeno. Fue desarrollado para mejorar la hidrólisis de los mismo y para poder reducir en gran medida los efectos indeseados causados por la mayoría de los antiinflamatorios no esteroideos. Ellos corroboraron que el polímero que formaba el profármaco era estable en el ambiente gástrico y liberaba el fármaco lentamente, además de reducir los efectos gastrintestinales de los AINEs (Wang et al., 2010).

A nivel nacional y mundial, las infecciones nosocomiales y en la fase de recuperación por quemaduras y/o lesiones y las bacteriemias relacionadas con el uso de catéteres intravasculares son problemas de salud importantes, por lo que el estudio de estos polímeros profármacos, forma las bases para la futura obtención de hidrogeles y/o el injerto de los polímeros en dispositivos médicos como el caso de los catéteres, ya que estos darían a las personas que sufran de estos problemas una opción confiable y segura de que su recuperación será exitosa y/o su terapia de recuperación no tendrá que ser tan compleja como se acostumbre.

Después de las pruebas realizadas a los polímeros profármacos se tendrá suficiente información para comparar su cinética de hidrólisis-liberación entre esta forma farmacéutica con los hidrogeles que se lleguen a sintetizar en otro proyecto y/o con polímeros injertados en silicatos y en el caso de que se logre comprobar su capacidad antimicrobiana de igual manera en los hidrogeles, podría ser de utilidad para muchas personas que padezcan lesiones en la piel en el futuro o deban hacer

uso de un CVC, ya que en muchos casos es necesario para la monitorización y tratamiento de pacientes en estado crítico y o recuperación.

1.4 Hipótesis

La hipótesis de este proyecto radica en que los polímeros poli(ácido metacriloioxi-*o*-benzónico), poli(ácido metacriloioxi-*m*-benzónico) y poli(ácido metacriloioxi-*p*-benzónico), podrían comportarse como polímeros profármacos, ya que el mecanismo de liberación del principio activo se podría llevar a cabo por un proceso de hidrólisis de los grupos colgantes de las cadenas poliméricas; esto les conferiría una alta respuesta al pH del medio y por lo tanto una liberación controlada de ácido *o*-hidroxibenzoico, *m*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzoico a pH fisiológicos.

1.5 Objetivo general

Síntesis de monómeros ácido metacriloioxi-*o*-benzónico (MAOB), ácido metacriloioxi-*m*-benzónico (MAMB), ácido metacriloioxi-*p*-benzónico (MAPB) y sus respectivos polímeros, su caracterización, y la evaluación de su comportamiento como comprimidos, para su estudio con relación a cinéticas de hidrólisis-liberación de activos a diferentes pH's fisiológicos y la evaluación de sus de propiedades antimicrobianas y de viabilidad celular.

1.6 Objetivos específicos

- Síntesis de monómeros MAOB, MAMB y MAPB, su caracterización por FTIR-ATR, UV-Vis y RMN-¹H.
- Síntesis poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB), su caracterización por FTIR-ATR, UV-Vis y DLS
- Generación de comprimidos en base a los polímeros sintetizados.

- Estudio de la cinética de hidrólisis-liberación del ácido *o*-hidroxibenzoico, *m*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzoico por CLAR y Gases-Masas a pH = 1.2, 6.8 y 7.4.
- Pruebas microbiológicas de los diferentes sistemas elaborados.
- Realización de pruebas de citotoxicidad en líneas celulares.

2. MARCO TEÓRICO

Los polímeros naturales o sintéticos han sido parte de la vida de nuestros antepasados, sabiendo lo que son o no, han sido utilizados de muchas maneras a través de la historia desde refugios prehistóricos hechos de madera y paja con resistencia atribuida a la celulosa, un biopolímero de la glucosa, ropa hecha de cuero y pelo de animales fuerte y flexible debido a las proteínas, las cuales son biopolímeros de los aminoácidos, hasta la actualidad en la que ya se han descubierto innumerables polímeros y su respectivo monómero o monómeros y se les han dado diversos usos en muchas áreas de la ciencia como la medicina y la industria química-farmacéutica; dando como resultado una gran cantidad de biomateriales empleados en prótesis, en vehículos farmacéuticos, para elaboración de recipientes, etc.

El vocablo polímero significa una molécula constituida por la repetición de una unidad más simple: los monómeros que son pequeñas moléculas de las que se parte para formar los polímeros [Del griego:(πολύ) poli = muchos; (μέρος) meros= parte, mono =uno] (Ravve, 2013).

Por dar un ejemplo de esto, tomemos en cuenta la **Figura 1**; un polímero, que como ya se mencionó es una molécula grande compuesta de muchas unidades más pequeñas (monómeros) unidas entre sí, en este caso sería el polímero molecular de bloques LEGO mientras que los monómeros serían el 1,1,2,2-tetracloroetano y el 1,2-dicloroetano que dan lugar a un copolímero, el cual es un polímero con dos o más monómeros diferentes unidos covalentemente.

En la actualidad cuando hablamos de polímeros, generalmente nos referimos a polímeros orgánicos sintéticos en vez de a biopolímeros orgánicos naturales como el ADN, la celulosa y una proteína, o polímeros inorgánicos como el vidrio y el concreto (L. J. Wade, 2012).



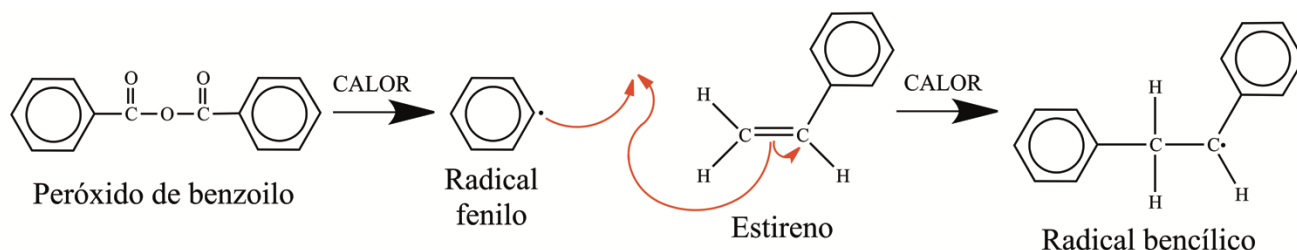
1,2-dicloroetano a 60 °C

2018).

2.1 Polimerización vía radicales libres

La polimerización por radicales libres ocurre cuando un alqueno ideal y de interés se calienta con un iniciador de radicales. Por ejemplo, el estireno se polimeriza a poliestireno cuando se calienta a 100 °C en presencia de peróxido de benzoilo (**Figura 2**). Esta polimerización por crecimiento de cadena es una reacción en cadena de los radicales libres. El peróxido de benzoilo se rompe cuando se calienta para formar dos radicales carboxilo, los cuales se descarboxilan rápidamente para formar los radicales fenilo (L. J. Wade, 2012).

Paso de iniciación: el iniciador forma un radical que reacciona con el monómero para iniciar la cadena.



Paso de propagación: se adiciona a la cadena otra molécula de monómero.

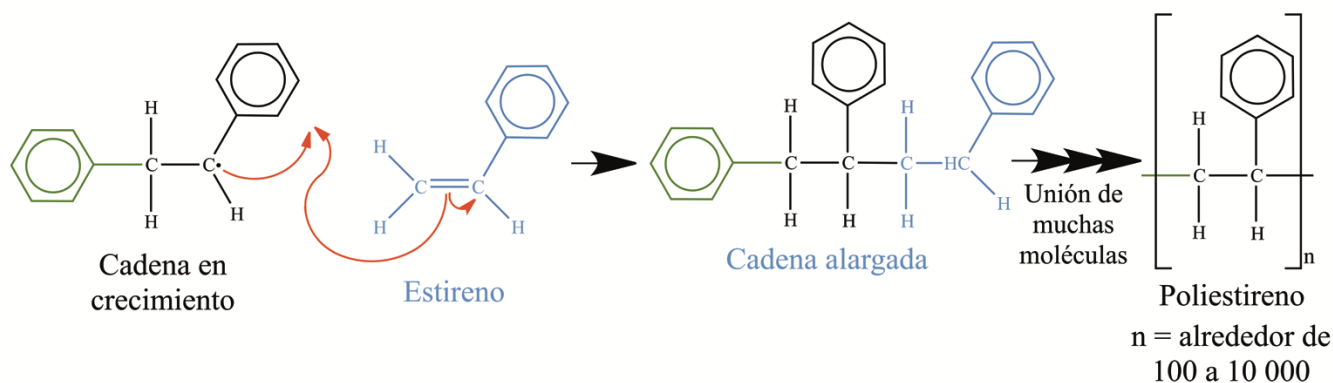


Figura 2. Polimerización por radicales libres (L. J. Wade, 2012).

Se adiciona un radical fenilo al estireno para formar un radical bencílico que se estabiliza por resonancia. Esta reacción comienza el crecimiento de la cadena de polímero. Cada paso de propagación adiciona otra molécula de estireno a la cadena en crecimiento. Esta adición se lleva a cabo con una orientación en la que se forma otro radical bencílico estabilizado por resonancia. El crecimiento de la cadena puede continuarse con la adición de varios cientos o varios miles de unidades de estireno. Con el tiempo, la reacción en cadena se detiene por el acoplamiento de dos cadenas o por la reacción con una impureza (como el oxígeno), o simplemente porque se acaba el monómero (L. J. Wade, 2012).

2.2 Polímeros profármacos

En los últimos años, los profármacos se han convertido en sistemas para mejorar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de los candidatos a ser fármacos. Se ha demostrado que los profármacos superan las barreras en la formulación y el suministro de fármacos, como la escasa solubilidad acuosa, la inestabilidad química, el rápido aclaramiento sistémico, la toxicidad y la orientación de fármacos (Rautio et al., 2008). Recientemente, se han sintetizado monómeros de ciprofloxacina y profármaco de norfloxacina polimerizables, obviando la necesidad de reacciones de conjugación post polimerización (D Das et al., 2018; Debobrato Das et al., 2017; Su et al., 2018). Se demostró que los enlaces éster fenólicos se hidrolizaron significativamente más rápido (~ 10 días) que los ésteres alifáticos (> 35 días) (Debobrato Das et al., 2016). Ambos estudios demostraron la eficacia antibacteriana in vitro y la liberación de fármacos. Estos resultados iniciales brindan un espacio emocionante para la funcionalidad adicional de profármacos poliméricos, la importancia y todo el nuevo horizonte que abren estos avances en tecnología farmacéutica.

Un polímero profármaco aumenta la solubilidad acuosa y la biodistribución manteniendo las propiedades farmacológicas inherentes del fármaco (Oliyai, 1996). Existen tres tipos principales de polímeros profármacos, el primer tipo (**Figura 3**) se desintegra en el interior de las células y forma una o más sustancias activas, el segundo que comunmente están formados por dos o más sustancias, requiere de condiciones intracelulares específicas para que las sustancias que lo componen reaccionen entre sí para formar un fármaco activo y el tercer tipo de polímero profármaco, son los sistemas de administración dirigidos, compuesto generalmente por un fragmento o resto de direccionamiento, un acarreador y uno o más componentes activos (Allen, 2002).

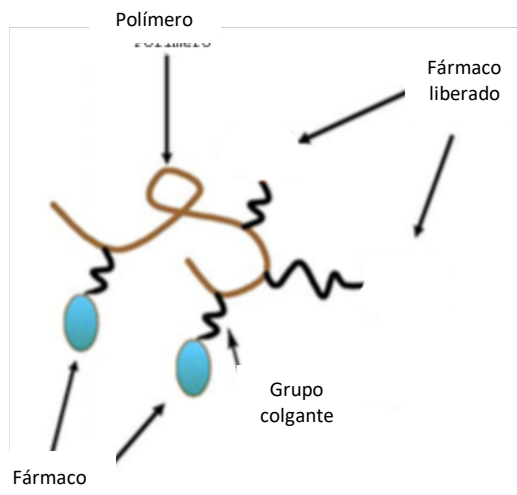


Figura 3. Esquematzación de un polímero profármaco de tipo 1 (Allen, 2002).

2.3 Tipos de liberación de fármacos

Los dispositivos tradicionales de administración de fármacos que generalmente tienen un control muy deficiente sobre las concentraciones de estas sustancias en el plasma y que por lo tanto dan como resultado tratamientos poco eficaces son las cápsulas, tabletas, parches, inyectables, gotas supositorios y spray (Escobar J.L., García D.M., Zaldivar D., 2002).

En los tratamientos convencionales los niveles de concentración varían como se muestra en la **Figura 4**. Se alcanzan concentraciones elevadas inicialmente, para luego disminuir rápidamente acercándose a valores ineficaces. Esto se trata de evitar administrando dosis sucesivas para mantenerse más o menos cerca del nivel óptimo de eficacia. Sin embargo los sistemas que controlan adecuadamente la liberación de medicamentos no requiere de dosis repetidas y mantienen concentraciones en el rango efectivo y no tóxico (Sáez V., Hernández E., 2004).

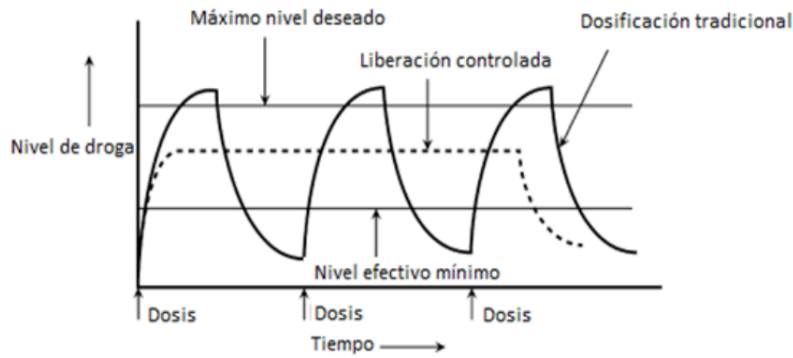


Figura 4. Comparación entre la concentración en sangre de un tratamiento convencional de dosis sucesivas contra un sistema ideal de dosificación controlada de la droga a través del tiempo de liberación (Pesquera et al., 2019).

Sistemas de liberación sostenida: son formas farmacéuticas que liberan rápidamente la dosis de fármaco necesaria para obtener la acción terapéutica, posterior a esto liberaran solo la cantidad adecuada y constante para que la velocidad de absorción sea igual a la de eliminación durante un tiempo prolongado (10 a 24 h normalmente). Por lo que estas formas farmacéuticas poseen una cinética de liberación de fármaco de orden cero, manteniendo así la concentración del fármaco en sangre constante (Suñé & Bel, 2002).

Sistemas de liberación prolongada: son formas farmacéuticas que liberan rápidamente la dosis de fármaco necesaria para obtener la acción terapéutica o incluso un exceso no nocivo para el organismo, posterior a esto liberaran fármaco de forma lenta y no necesariamente igualan la velocidad de absorción con la de eliminación. Por lo que estas formas farmacéuticas poseen una cinética de liberación de fármaco con una curva amplia y que varía dentro de la zona terapéutica, por lo tanto es una liberación lenta más no constante (Suñé & Bel, 2002).

Sistemas de liberación repetida: son formas farmacéuticas que liberan una dosis de fármaco simple y posterior a esto liberaran otra dosis similar, pero no existe liberación de fármaco en el

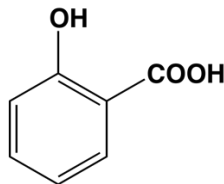
intervalo de tiempo entre una dosis y otra. Por lo que estas formas farmacéuticas liberan dos o más dosis de fármaco iguales espaciadas en el tiempo. Se puede diseñar un medicamento de liberación repetida introduciendo tres tipos de minigránulos (“pellets”) del fármaco en una cápsula dura de gelatina, de modo que cada tipo se disgregue a diferentes tiempos una vez que se ha administrado la cápsula (Suñé & Bel, 2002).

Sistemas de liberación retardada: son formas farmacéuticas que liberan una dosis de fármaco después de transcurrido un tiempo de latencia, por lo tanto no existirán niveles plasmáticos del fármaco hasta que la forma farmacéutica llegue a la zona del tracto digestivo en donde se desea que se libere. Ejemplos de ello lo constituyen los clásicos comprimidos gastrorresistentes y los sistemas colónicos, sistemas de liberación de fármacos en la primera porción del colon (Suñé & Bel, 2002).

2.4 Ácido salicílico (ácido *o*-hidroxibenzoico) y sus propiedades

En el trabajo realizado por Magaña et al., 2016 se sintetizaron películas de PP-g-2MBA, estas al igual que se espera en este trabajo, mostraron una cinética de liberación dependiente del pH. Por lo que la velocidad de liberación del profármaco esta mediada por la sensibilidad al pH de la hidrólisis de enlace éster, este mecanismo se ilustra en la **Figura 5**. Esperan que dispositivos médicos con 20% de injerto proporcionen una liberación controlada de ácido salicílico durante un periodo de varios días en el área en que se implanten sin afectar la viabilidad celular. Su técnica de injerto permite un control preciso de la cantidad de fármaco incorporado en el dispositivo y puede adaptarse a los requisitos del sitio de implantación (Magaña et al., 2016).

Tabla 1. Estructura del AS (ácido *o*-hidroxibenzoico) y algunos datos destacados de este fármaco (National Center for Biotechnology Information, 2021. PubChem Compound Summary for CID 338, Salicylic acid.) *(Tetko, 2005).

Nombre IUPAC			Solubilidad
Ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico			2.24 mg/mL a 25 °C, 11.3 mg/mL*
Peso molecular			Espectro UV
138.12 g/mol			210, 234, 280, 303 nm
CAS	pKa		Nvls. plasmáticos terapéuticos
69-72-7	2.97		0.15–0.30 mg/mL
Coeficiente de partición			182

El efecto terapéutico del ácido salicílico o AOH es dependiente de la dosis, su efecto antiplaquetario se presenta a dosis de 75 a 100 mg, usado a estas dosis para la prevención de trombosis coronaria y con dosis elevadas de 500 a 1000 mg se obtiene el efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético.

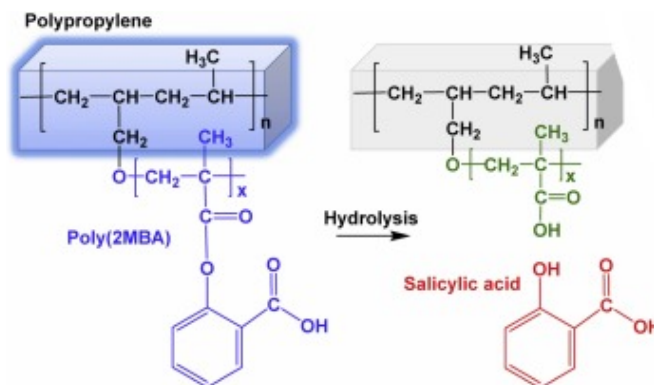


Figura 5. Descripción gráfica del mecanismo de hidrólisis del ácido salicílico (AOH, ácido *o*-hidroxibenzoico) de las películas de PP-g-2MBA sintetizadas (Magaña et al., 2016).

Este profármaco se indica también en el tratamiento de reacciones inflamatorias a enfermedades traumáticas y autoinmunes como: el Lupus, la artritis reumatoide y la enfermedad de Kawasaki; también está indicada para el tratamiento de la fiebre reumática (Sáez V., Hernández E., 2004).

Además de estas actividades, se sabe, que los fármacos antipiréticos, en este caso el ácido salicílico también tiene efectos antimicrobianos directos e indirectos. Entre sus efectos directos; en cuanto a la motilidad son que el AOH reduce la motilidad de *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *P. aeruginosa* (Kunin, Tong Hua Hua, & Bakaletz, 1995). Sin embargo, se ha demostrado únicamente este efecto a niveles plasmáticos terapéuticos [0.15–0.30 mg/mL, (Dargan, Wallace, & Jones, 2002)] en *E. coli* (Repaske & Adler, 1981), mientras que, a concentraciones ligeramente más altas, el AS reduce su producción de flagelina y de igual manera, la producción de flagelo en *P. mirabilis* (Kunin et al., 1995).

En cuanto a la adherencia, el AOH a niveles terapéuticos reduce la unión de fibronectina en *S. aureus* y la adherencia de *E. coli* en catéteres (B. F. Farber & Wolff, 1993; Bruce F. Farber & Wolff, 1992) reduciendo la producción de fimbrias (Kunin, Hua, Guerrant, & Bakaletz, 1994). Mientras que, a concentraciones levemente superiores al nivel plasmático terapéutico, reduce la producción de adhesina en *S. epidermidis*, la producción de fimbrias en *E. coli* (Kupferwasser et al., 2003; Muller, Al-Attar, Wolff, & Farber, 1998) y en concentraciones aún más altas, también reduce la producción de hemaglutinina en *E. coli* (Kang, Balasubramanian, Koshi, Mathan, & Mathan, 1998).

Por otro lado, en cuanto al metabolismo, el AOH a una concentración superior a los niveles plasmáticos terapéuticos conduce a la regulación a la baja de la gluconeogénesis y la glucólisis en *S. aureus* y a la activación del transporte de azúcar (sorbitol y manosa) en *E. coli* (Pomposiello, Bennik, & Demple, 2001).

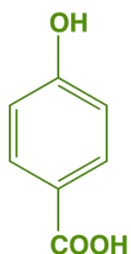
2.5 Propiedades del ácido *m*-hidroxibenzoico y el ácido *p*-hidroxibenzoico

El ácido *p*-hidroxibenzoico (**Tabla 2**) es comúnmente utilizado como conservante utilizado en cosméticos, películas, agentes conservantes de madera, alimentos, etc. (EPA Chemical and Products Database (CPDat)).

Los ésteres o parabenos del ácido *p*-hidroxibenzoico, son agentes antimicrobianos muy efectivos y son ampliamente empleados como conservadores de alimentos, cosméticos, artículos de tocador y productos farmacéuticos, incluidas las formulaciones pediátricas (Elder, 1984; Soni, Carabin, & Burdock, 2005).

Tabla 2. Estructura del APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) y algunos datos destacados de esta molécula (Billardello & Berthod, 2002; Goto et al., 2011, National Center for Biotechnology Information, 2021.

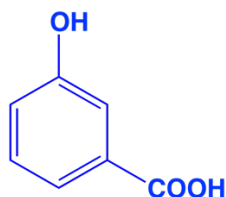
PubChem Compound Summary for CID 135, 4-Hydroxybenzoic acid.) *(Tetko, 2005).

Nombre IUPAC			Solubilidad	
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico			5.0 mg/mL a 25 °C, 11.9 mg/mL*	
Peso molecular			Espectro UV	
138.12 g/mol			250, 260 nm	
CAS	pKa		Nvls. plasmáticos terapéuticos	
99-96-7	4.54	Coefficiente de partición		
38				

Su actividad antimicrobiana aumenta a medida que aumenta la longitud de la cadena del grupo éster. Los metil-y propil-parabenos son los más utilizados para los fines anteriores (Elder, 1984). Después de ser absorbidos, los parabenos se hidrolizan principalmente a ácido *p*-hidroxibenzoico, que se metaboliza aún más a los conjugados de glicina, glucurónido y sulfato, y

se excreta en la orina (Abbas et al., 2010). Al contrario que otros conservadores los parabenos son activos a pH 7 y superiores (Fennema & Tannenbaum, 2010).

Tabla 3. Estructura del AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y algunos datos destacados de esta molécula (Goto et al., 2011, National Center for Biotechnology Information, 2021. PubChem Compound Summary for CID 7420, 3-Hydroxybenzoic acid.) *(Tetko, 2005).

Nombre IUPAC			Solubilidad		
Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico			7.25 mg/mL a 25 °C, 10.2 mg/mL*		
Peso molecular			Espectro UV		
138.12 g/mol			231, 290 nm		
CAS	pKa		Nvls. plasmáticos terapéuticos		
99-06-9	3.84	Coefficiente de partición			
32					

De acuerdo con las conclusiones del trabajo presentado por Khan et al., 2016; al igual que el AS o AOH, las dosis orales diarias bajas de ácido *m* o *p*-hidroxibenzoico también son efectivas al poseer actividades antiinflamatorias y analgésicas en modelos animales conocidos convencionalmente para los AINE. El(los) objetivo(s) y mecanismo(s) farmacológico(es) involucrados(s) en las actividades antiinflamatorias y analgésicas de los ácidos *m* o *p*-hidroxibenzoico no son necesariamente idénticos a los del AOH y otros AINE y antidepresivos (Khan, Chatterjee, & Kumar, 2016). Otras aplicaciones del ácido *m*-hidroxibenzoico (**Tabla 3**) son que es usado como aditivo alimentario, ya que funciona como agente aromatizante o adyuvante (FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN)).

2.6 Técnicas de caracterización

2.6.1 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (FTIR-ATR) constituye la principal técnica para el análisis estructural de diversas especies orgánicas y bioquímicas. Como su nombre lo indica, el análisis se lleva a cabo en la región de infrarrojo, la cual se divide en tres regiones espectrales. La de mayor uso es la región de infrarrojo medio, que abarca desde aproximadamente 670 hasta los 4000 cm^{-1} , con la cual se pueden determinar especies en muestras sólidas, líquidas o gaseosas puros, el análisis de estas muestras puede ser tanto cualitativo como cuantitativo, de eso dependerá si debemos tener puras nuestras muestras y el tipo de medición que se requerirá (Skoog et al., 2005).

Al igual que otras técnicas como la RMN, los espectros de IR proporcionan huellas dactilares que sirven para identificar tipos de enlaces y compuestos, al comparar espectros. En la **Figura 6** se puede apreciar un ejemplo de un espectro de absorción infrarrojo a partir de una película fina de poliestireno. En el eje “x” se encuentra la longitud de onda en cm^{-1} y en el eje “y” se encuentra la transmitancia en porcentaje (Skoog et al., 2005).

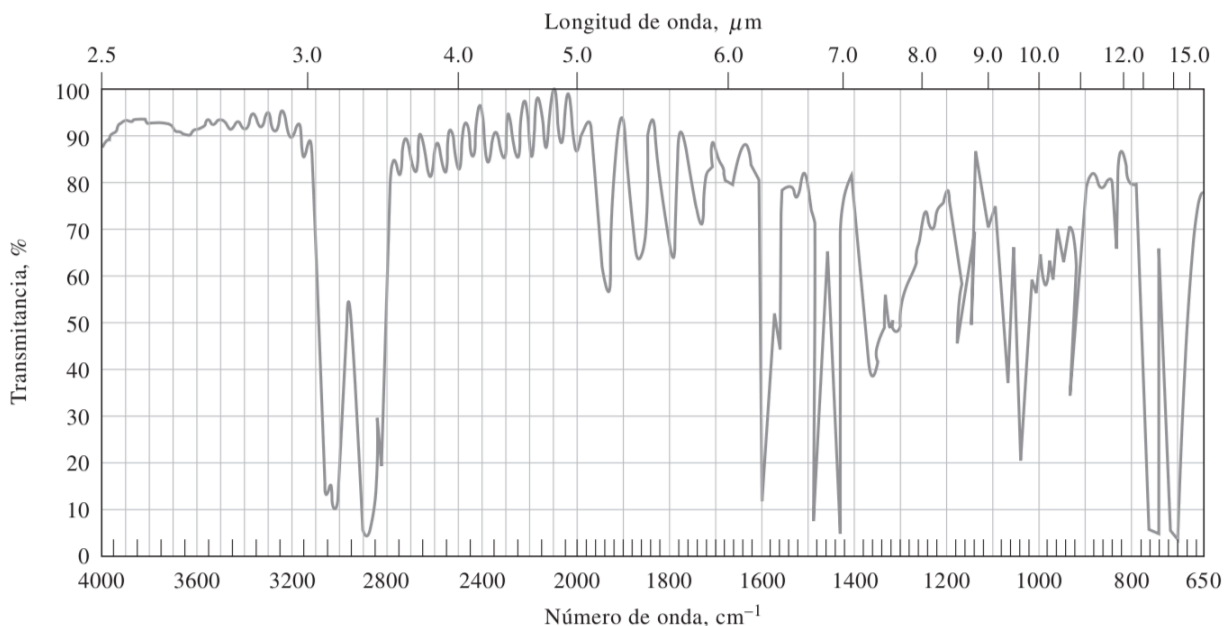


Figura 6. Espectro de absorción IR de una película fina de poliestireno, se pueden apreciar los ejes y sus unidades además de las señales que presenta esta molécula al ser sometida a esta técnica de caracterización (Skoog et al., 2005).

2.6.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H)

La resonancia magnética nuclear (RMN o NMR, por sus siglas en inglés “*Nuclear magnetic resonance*”) constituye una técnica con un amplio y reconocido espectro de aplicaciones en el campo del análisis estructural. Su fundamento consiste en que en presencia de un fuerte campo magnético las energías de los núcleos de ciertos elementos se dividen en dos o más niveles cuánticos como consecuencia de las propiedades magnéticas de estas partículas. Pueden provocarse transmisiones entre los niveles de energía inducidos magnéticamente por la absorción de radiación electromagnética de frecuencia apropiada, de igual modo que transiciones electrónicas son causadas por la absorción de radiación ultravioleta o visible (Skoog et al., 2005).

Los espectros de RMN proporcionan “huellas dactilares” principalmente de carbono o hidrógeno en muestras orgánicas, permitiendo determinar la estructura de los compuestos orgánicos, su pureza y sus mezclas. La espectroscopia de RMN, al igual que otras técnicas no destructivas, como la espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF), permiten evaluar las modificaciones estructurales que sufren moléculas al ser sometidas a diferentes tipos de reacciones (Simpson, 2001)

Un espectro tradicional de RMN- ^1H como el de la **Figura 7**, muestra la amplitud de la señal contra partes por millón (ppm) de la frecuencia base del espectrómetro empleado, esto debido a que la frecuencia de resonancia de los núcleos depende de la intensidad del campo magnético estático (Parker et al., 2014).

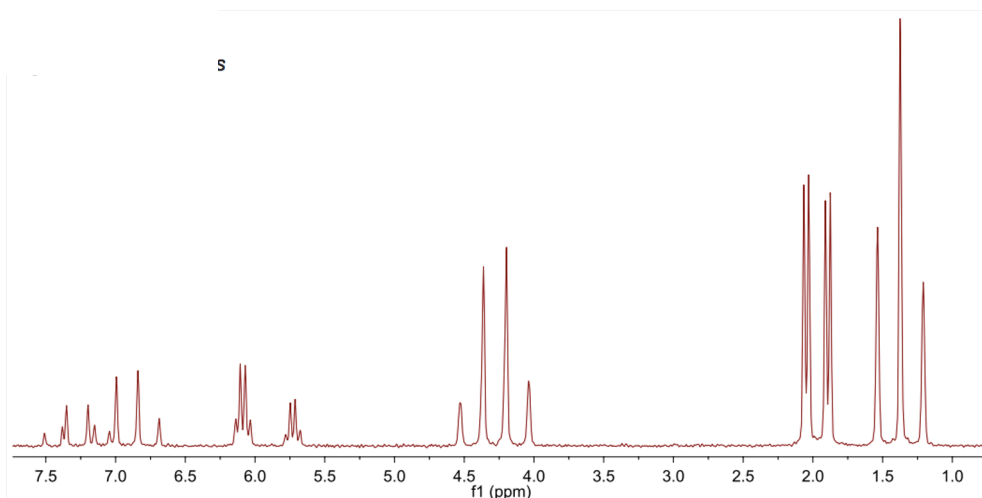


Figura 7. Espectro tradicional de RMN- ^1H en el cual se muestra la amplitud de la señal contra partes por millón (ppm) (Parker et al., 2014).

Los avances en la tecnología de imanes en la última década han permitido el desarrollo de espectrómetros de RMN compactos, de bajo costo y con una sensibilidad mejorada, y más

importante aún, homogeneidad del campo magnético de manera que las resonancias ^1H de pequeñas moléculas se puedan diferenciar cualitativa y cuantitativamente en función de su cambio químico. (Nordon, McGill, & Littlejohn, 2001)

2.6.3 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés “*High Performance Liquid Chromatography*”) es una de las herramientas más importantes de la química analítica y la industria farmacéutica. En esta última se aplica en todas las etapas de descubrimiento, desarrollo y producción de fármacos (Ackermann, 2007), permitiendo evaluar la pureza de las nuevas moléculas, monitorear los cambios que sufren las moléculas en reacciones sintéticas, llevar el control de calidad de diversos procesos entre otras (Ahuja, 2007).

La CLAR tienen la capacidad de separar e identificar los compuestos, desde fármacos, impurezas de reacción, intermediarios de reacción y hasta productos de degradación, que se puedan disolver en un líquido (Riddhiben, Piyushbhai, & Natubhai, 2011). Para esto, la solución de muestra es inyectada en una columna de material poroso (fase estacionaria) y la fase líquida (fase móvil) se bombea a una presión alta a través de la columna. El principio de la separación ocurre en la absorción de la muestra en la columna, ya que, en función de su afinidad a esta, será la velocidad con la que salga de la columna y se detecte la molécula (Kumar Bhardwaj, 2015).

Esta técnica ofrece la sensibilidad ideal para determinaciones de nivel traza y un alto grado de automatización. Es aplicable a una gran cantidad de clases de medicamentos ya que existen una gran variedad de fases estacionarias y modos de operación en un equipo de CLAR. Sus límites típicos de detección de impurezas en medicamentos son menores a 0.1% en la mayoría de los casos e incluso usando detectores UV convencionales (Nageswara Rao & Nagaraju, 2003).

2.6.4 Dispersión de luz dinámica (DLD) y dispersión de luz estática (DLE)

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "*Dynamic light Scattering*"), es una técnica empleada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión (FOORD et al., 1970), o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. El principio de esta técnica se basa en la dispersión de la luz que se genera por el movimiento browniano de las partículas en suspensión, el cual provoca un desplazamiento en la longitud de onda, lo que permite determinar el coeficiente de difusión de las partículas y empleando la ecuación de Stokes-Einstein se logra determinar el tamaño de las mismas (Kaszuba, McKnight, Connah, McNeil-Watson, & Nobbmann, 2007).

Por otro lado, la dispersión de luz estática (DEL o SLS, por sus siglas en inglés "*Static Light Scattering*") es una técnica utilizada para medir la intensidad de la luz dispersada y mediante esta dispersión, obtener un promedio del peso molecular de una macromolécula como proteínas o polímeros (Pitzer, 2002).

2.7 Pruebas biológicas

2.7.1 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en disco de Kirby-Bauer

Existe una amplia variedad de métodos mediante los cuales se puede determinar la susceptibilidad antimicrobiana de un patógeno, entre los que se encuentran: el método por difusión en disco también conocido como técnica de Kirby-Bauer (**Figura 8**), dilución en agar o microdilución en caldo y difusión en tiras de gradiente (Murray et al., 2004). Uno de los métodos que se emplearon en este trabajo fue la difusión en disco de Kirby-Bauer, debido a que es de bajo costo y más sencilla de realizar para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, pero los resultados pueden ser difíciles de interpretar. A pesar de esto, estas pruebas pueden ser útiles para detectar aislamientos y clasificarlos como susceptibles, intermedios, resistentes o no susceptibles a varios antimicrobianos. Sin embargo, dado que esta prueba no determina las CMI, no es útil para detectar tendencias sutiles de susceptibilidad decreciente (CDC & Ncird, n.d.).

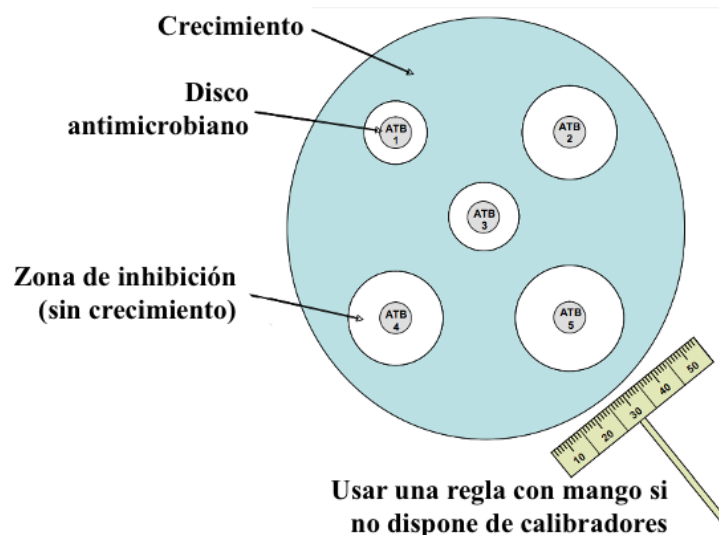


Figura 8. Prueba de susceptibilidad por difusión en disco: colocación aproximada de los discos y medición de los diámetros de las zonas de inhibición. ATB1 = antibiótico 1, ATB2 = antibiótico 2, etc (CDC & Neird, n.d.).

2.7.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Esta prueba, determina la concentración más baja de un agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible de un microorganismo (Claesson, van der Wal, & Fogden, 2007). Mientras que la Concentración Mínima Bactericida (MBC) determina la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para lograr la muerte bactericida, definida como una reducción del 99,9% en el inóculo inicial. Los ensayos MIC y MBC se realizan como se aprecia en la **Figura 9**. Para ello, (1) primero se preparan diluciones de los compuestos de prueba y un antibiótico de control de calidad (QC) en una placa de microdilución. (2) Se crea a continuación, el inóculo tomando algunas colonias de una placa de agar con un hisopo estéril, para preparar una suspensión microbiana comparada al tubo 0.5 del estándar de McFarland, para posteriormente, diluirla en el medio.

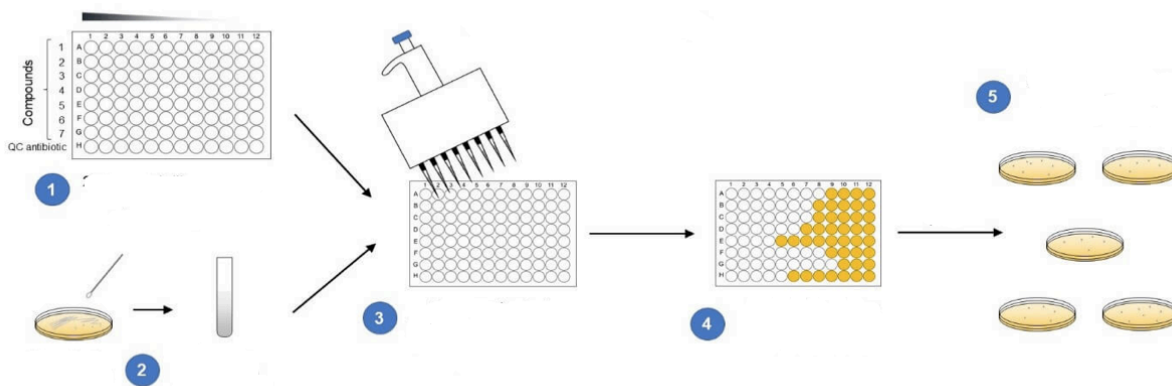


Figura 9. Prueba de CMI y CMB (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*
A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.).

(3) Se distribuye el inóculo en la placa de microdilución con los compuestos de prueba diluidos en serie y se incuba la placa de microdilución. (4) Se lee la placa de microdilución para determinar el valor de MIC. (5) Finalmente, se coloca una porción de cada pocillo en un medio de agar apropiado, se incuba el agar y se verifica si hay colonias para determinar el MBC (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).

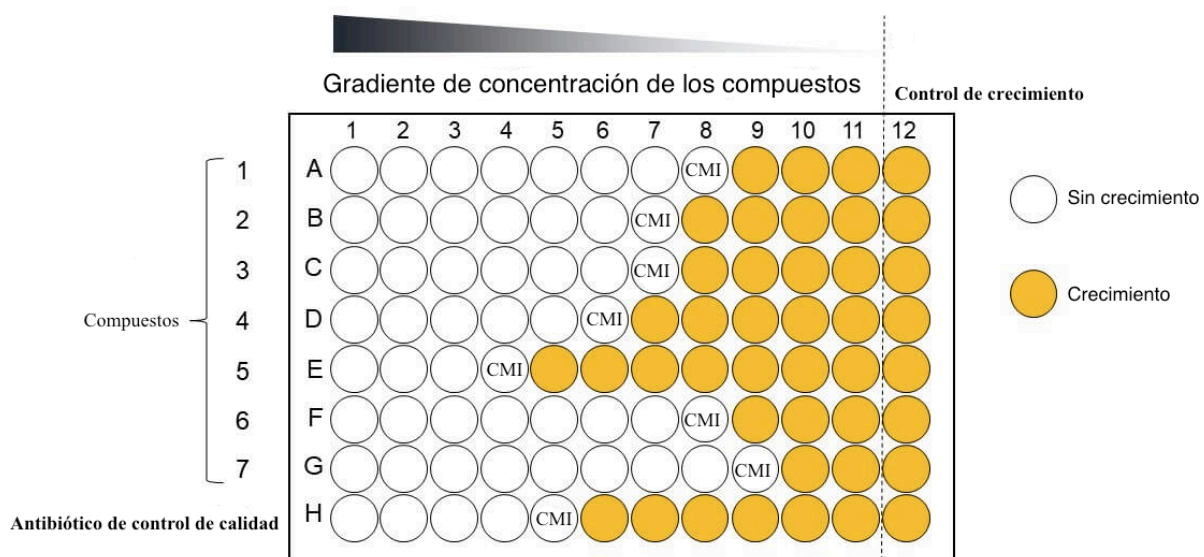


Figura 10. Interpretación de las pruebas de CMI y CMB (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).

En la **Figura 10**, "sin crecimiento" está representado por círculos blancos y "crecimiento" está representado por círculos amarillos. El valor de CMI es la concentración más baja de un compuesto/antibiótico a la que no se observa crecimiento (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).

2.7.3 Ensayo de MTT

Las sales de tetrazolio han sido parte de una amplia variedad de bioensayos a lo largo de las últimas décadas, tales como mediciones de actividad de oxidorreductasa, localización subcelular de oxidorreductasas, detección de radicales superóxido, detección de micoplasma y, sobre todo, viabilidad celular, microbiana y estimación del crecimiento (Bernas & Dobrucki, 2000).

Una de las sales más comúnmente usada en bioensayos es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (MTT). Los protocolos basados en esta sal de tetrazolio pueden ser aplicados en líneas celulares de mamíferos, bacterias y hongos. Aunque difieren drásticamente entre sí en casi todos los aspectos de las condiciones de ensayo (Young, Phungtamdet, & Sanderson, 2005). Lo que se conoce acerca de este bioensayo es que la reducción de esta sal de tetrazolio puede ser catalizada por las enzimas intracelulares que residen en varias regiones de la célula como las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el citosol, así como las oxidorreductasas asociadas con las membranas plasmáticas (Berridge & Tan, 1993).

El bioensayo de MTT se usa frecuentemente para medir el número de células metabólicamente activas en ensayos in vitro. Se fundamenta en la conversión de MTT amarillo soluble en agua en el producto final púrpura formazán insoluble en agua, por la deshidrogenasa mitocondrial como se muestra en la **Figura 11**. Donde la cantidad de formazán formado será proporcional al número de células metabólicamente activas (Mosmann, 1983).

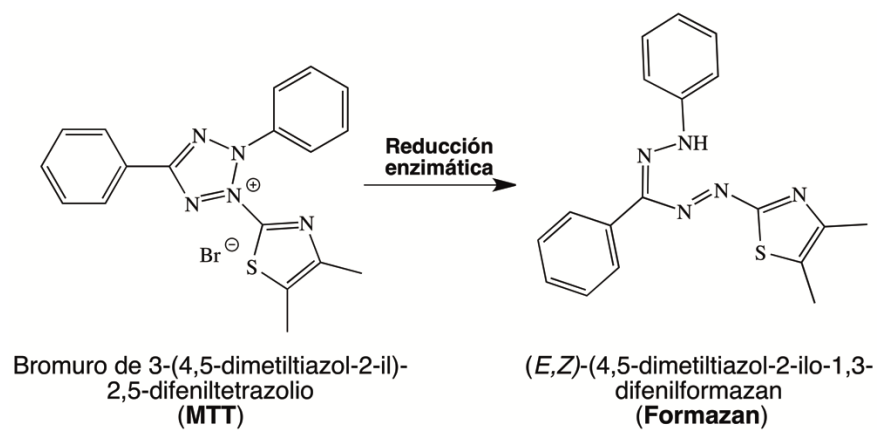


Figura 11. Se muestra la reacción general que ocurre en un ensayo de MTT, en la cual esta sal de tetrazolio (amarillo, soluble en agua) se convierte enzimáticamente en formazán (púrpura, insoluble en agua) (Mosmann, 1983).

3. EXPERIMENTAL

Tabla 4. Reactivos, solventes y gases empleados en este proyecto.

No.	Reactivos, solventes o gases	Marca
Síntesis de monómeros		
1	Ácido salicílico (AS, grado reactivo)	Sigma-Aldrich Inc.
2	Ácido <i>m</i> -benzoico (AMH, grado reactivo)	Sigma-Aldrich Inc.
3	Ácido <i>p</i> -benzoico (APH , grado reactivo)	Sigma-Aldrich Inc.
4	4-dimetilaminopiridina (DMAP)	Sigma-Aldrich Inc.
5	Trietilamina (TEA)	Sigma-Aldrich Inc.
6	Diclorometano (DCM)	Sigma-Aldrich Inc.
7	Anhídrido metacrílico	Sigma-Aldrich Inc.
8	Ácido clorhídrico 38% (HCl)	Sigma-Aldrich Inc. (CAS 7647-01-0)
9	Agua desionizada	
10	Éter etílico	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.
11	Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich Inc. (CAS 7487-88-9)
12	Metanol	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.
Purificación de monómeros y evaluación de pureza		
13	Hexano	Sigma-Aldrich Inc.
14	Acetato de etilo	Sigma-Aldrich Inc.
	Metanol	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.
Síntesis de polímeros		
15	Azobisisobutironitrilo (AIBN)	Sigma-Aldrich Inc.
16	p-Dioxano (anhidro, 99.8%)	Sigma-Aldrich Inc.
17	Éter de petróleo	
18	Nitrógeno grado alta pureza	INFRA S.A. de C.V.
	Metanol	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.
Purificación de polímeros y evaluación de pureza		
	p-Dioxano	Sigma-Aldrich Inc.
	Éter de petróleo	
	Metanol	Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.
	Hexano	Sigma-Aldrich Inc.
	Acetato de etilo	Sigma-Aldrich Inc.
Espectroscopía de infrarrojo por transformada de fourier con reflectancia total (FTIR-ATR)		
18	Acetona	Sigma-Aldrich Inc.
Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H)		
19	Cloroformo deuterado (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich Inc.
20	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich Inc.
Reactivos, solventes y gases.		

No.	Reactivos y solventes	Marca
Determinación de peso molecular por dispersión dinámica de luz (DLS)		
21	Metanol (anhidro, 99.8%)	Sigma-Aldrich Inc. (CAS 67-56-1)
22	Tolueno (grado reactivo)	Mallinckrodt Specialty Chemicals Co
Estudio hidrolisis-liberación		
23	Hidróxido de sodio (NaOH)	(J.T. Baker)
24	Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Inc.
25	Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Inc.
26	Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, ≥99)	Sigma-Aldrich Inc. (CAS 7558-80-7)
27	Cloruro de sodio (NaCl)	Faga lab (CAS 7647-14-5)
	Agua desionizada	
	Ácido clorhídrico 38% (HCl)	Sigma-Aldrich Inc. (CAS 7647-01-0)
Método de análisis para ácido <i>o</i>-hidroxibenzoico, ácido <i>m</i>-hidroxibenzoico y ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico libre de los comprimidos en CLAR		
28	1-heptanosulfonato de sodio	Sigma-Aldrich Inc. (CAS 22767-50-6)
29	Acetonitrilo (ACN, grado CLAR)	Fermont (CAS 75-05-8)
30	Ácido acético glacial (CH ₃ COOH)	Mallinckrodt Specialty Chemicals Co
31	Ácido fórmico (AF, 95%)	Fermont (CAS 64-18-6)
32	Metanol (grado CLAR)	(Spectrum Chemical Mfg. Corp.)
Prueba de susceptibilidad por difusión por discos		
33	Solución salina al 0.9 %	
34	Agar nutritivo	Hardy diagnostic
35	Agar Mueller Hinton	
36	Agar sabouraud	BDBioxon
Inhibición bacteriana en placa de 96 pocillos		
37	Medio deshidratado de infusión de cerebro corazón (ICC)	BDBioxon
38	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich Inc.
Citotoxicidad		
39	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)	
40	Solución de tripsina-EDTA	
41	Tinte azul de tripano (trypan blue)	
42	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (MTT)	Roche
43	Reactivo revelador	Roche
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	

3.1 Síntesis y purificación de monómeros

3.1.1 Síntesis de monómeros

La síntesis general de los monómeros b) ácido metacriloioxi-*o*-benzoico (MAOB), d) ácido metacriloioxi-*m*-benzoico (MAMB) y f) ácido metacriloioxi-*p*-benzoico, se lleva a cabo mediante un ataque nucleofílico por parte del oxígeno del grupo hidroxilo del a) ácido *o*-hidroxibenzoico, c) ácido *m*-hidroxibenzoico y e) ácido *p*-hidroxibenzoico a uno de los carbonilos presentes en el anhídrido metacrílico como se muestra en la **Figura 12**, completando así el proceso de esterificación. Este procedimiento fue descrito previamente en la literatura (Licea-Claverie, A., Rogel-Hernández, E., López-Sanchez, J.A., Castillo-Arámbula, L.A., Cornejo-Bravo, 2003).

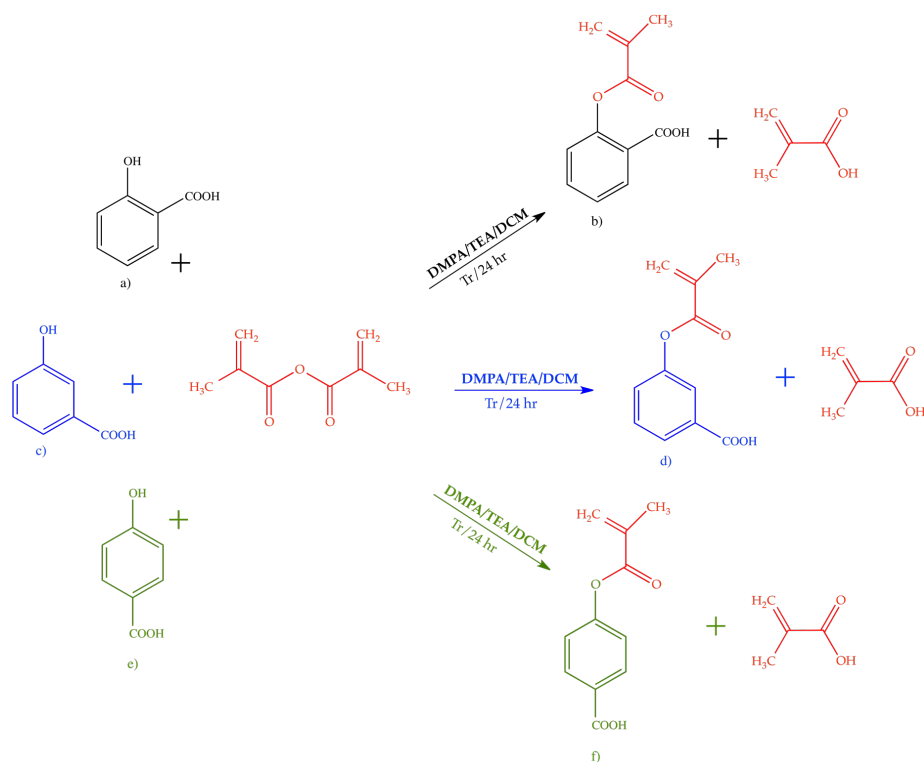


Figura 12. Reacción de síntesis para los monómeros b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB. (Licea-Claverie, A., Rogel-Hernández, E., López-Sanchez, J.A., Castillo-Arámbula, L.A., Cornejo-Bravo, 2003).

La síntesis en el laboratorio se llevó a cabo agregando 6.91 g de cualquiera de los tres reactivos de partida, a) ácido *o*-benzoico, c) *m*-benzoico y e) *p*-benzoico con 0.49 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador a un matraz bola, se solubilizó agregando 8.42 mL de trietilamina (TEA) y 20 mL de diclorometano (DCM) en agitación constante y a 0 °C en un baño de hielo.

Al observarse la incorporación de todos los sólidos, se procedió a adicionar gota a gota por medio de una bomba de adición 7.26 mL de anhídrido metacrílico durante un lapso de 3 horas con una jeringa de plástico. Al terminó del goteo se mantuvo la mezcla en agitación y a temperatura ambiente durante 24 h.

Terminadas las 24 h de agitación continua y a temperatura ambiente, la solución se transfirió a un vaso de precipitado a 0 °C y con agitación constante, alcanzando un pH de 3 con una solución 3 N de HCl, se observó la formación de precipitado. A esta solución con el precipitado se le realizó una extracción en un embudo de separación con 20 mL éter etílico, seguido de un lavado en el mismo embudo de separación con 20 mL de una dilución de HCl y posterior a esto, un lavado final con 20 mL de agua destilada.

A la fase orgánica resultante de la extracción se le agregó MgSO₄ anhidro para eliminar el exceso de agua en la solución, que después fue filtrada a vacío con un filtro de número 1 (110 mm) y vertida en un recrystalizador, en el cual duró un día en campana para evaporar el solvente. Al sólido obtenido de la recrystalización se lavó al vacío con un filtro de número 1 (110 mm), primero con 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente y después con 30 mL de agua a 40 °C. Se repitió en tres ocasiones el lavado para eliminar impurezas. Una vez finalizado el lavado, el producto se transfirió a un vaso de precipitado y se disolvió en metanol para posteriormente ser vertido en dos cajas Petri y 24 h a temperatura ambiente. Finalmente se dejó 8 horas a 40 °C al vacío.

3.1.2 Purificación de monómeros y evaluación de pureza

Para la purificación de los monómeros en posición *o* y *m*, se pesó 1 g y se llevó toda la cristalería y embudo a 65 °C en una estufa, se calentó hexano a 65 °C, se disolvió el monómero en el hexano caliente, y se filtró en caliente con un filtro de número 1 (110 nm), se procedió a verter la solución en una caja Petri y se dejó 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se dejó 8 horas a 40 °C al vacío.

Para la purificación del monómero en posición *p*, se pesó 1 g y se llevó toda la cristalería y embudo a 65 °C en una estufa y se calentó hexano a 65 °C, se disolvió el monómero en el hexano caliente, y se filtró en caliente con un filtro de número 1 (110 nm), al monómero que no se disolvió en hexano fue disuelto con acetona y se filtró con otro filtro de número 1 (110 nm), se procedió a verter la solución en una caja Petri y se dejó 24 h en campana. Finalmente, se dejó 8 horas a 40 °C al vacío.

Para evaluar la pureza de los tres monómeros se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) antes y después de la purificación. Para lo cual fue necesario realizar seis soluciones. Las soluciones de los monómeros se prepararon añadiendo individualmente 30 mg de MAOB, MAMB y MAPB, a tubos eppendorf y se disolvieron con 1 mL de metanol respectivamente, como eluyente fueron empleados 3 mL de una solución 50:50 de acetato de etilo/hexano. Esto se hizo a la par con las TLC de los polímeros.

3.2 Síntesis y purificación de polímeros

3.2.1 Síntesis de polímeros

En la **Figura 13**, se logra apreciar las reacciones generales para llevar a cabo el proceso de polimerización de los monómeros b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB, por vía radicales libres empleando azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador y *p*-dioxano como disolvente.

La síntesis en el laboratorio se llevó a cabo mezclando 0.5 g de cualquiera de los 3 monómeros de interés (2.43 mmol), 0.00425 g de AIBN (1% mol) como iniciador (para el caso del monómero en posición *p* se requirió el doble de iniciador) y 4 mL *p*-dioxano como disolvente en un matraz Schlenck. La mezcla se sometió a agitación constante para mejorar la solubilidad y homogenizar la solución.

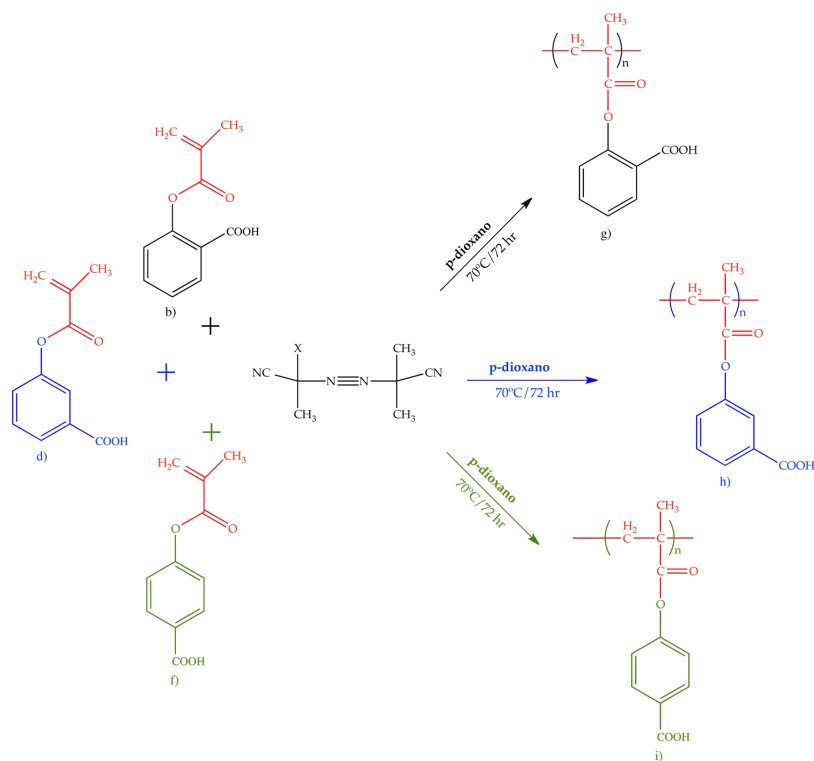


Figura 13. Reacción de síntesis para el g) poli(MAOB), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB) (Licea-Claverie, A., Rogel-Hernández, E., López-Sanchez, J.A., Castillo-Arámbula, L.A., Cornejo-Bravo, 2003).

Para mantener la solución en condiciones inertes, sin presencia de oxígeno; el matraz fue desgasificado empleando nitrógeno gaseoso en un flujo durante 5 min a temperatura ambiente y 10 a 0 °C para desplazar todo el oxígeno fuera del matraz.

Posterior a la desgasificación el matraz fue puesto en agitación en un baño de aceite a 70 °C durante 72 horas para asegurar el máximo rendimiento de la reacción de polimerización. Al finalizar los tres días, la solución obtenida fue decantada en un vaso de 100 mL con un exceso de éter de petróleo, se decantó el sobrenadante y se volvió a solubilizar con *p*-dioxano y se decantó nuevamente en éter de petróleo. Este último paso, se repitió en dos ocasiones más y al final el precipitado fue disuelto en metanol y en agitación constante, se filtró al vacío con filtro de número 1 y se vertió en una caja Petri; se dejó en campana a que se volatilizara el solvente por 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se dejó 8 horas a 40 °C al vacío.

3.2.2 Purificación de polímeros y evaluación de pureza

Para la purificación de los polímeros se pesaron 150 mg de cada polímero y se agregaron lentamente a 5 mL de *p*-dioxano en un vaso de precipitado con agitación, al no incorporarse completamente se llevó a un volumen final de 15 mL posterior a eso, se vertió en 50 mL de éter de petróleo en agitación también; se debe observar la formación de una masa chiclosa que quede adherida en el fondo del vaso. Posterior a esto se decantó el sobrenadante y se volvió a solubilizar el polímero en 15 mL de *p*-dioxano, este paso se repitió 3 veces y en la cuarta ocasión se solubilizó el polímero en metanol, se filtró al vacío, se agregó a cajas Petri y se dejó 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, 8 horas a 40 °C al vacío.

Para evaluar la pureza de los tres polímeros se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) antes y después de la purificación. Para lo cual fue necesario realizar seis soluciones. Las soluciones de

los polímeros fueron preparadas de la misma forma que los monómeros, añadiendo individualmente 30 mg de poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAOB), a tubos eppendorf y fueron disueltos con 1 mL de metanol respectivamente. Como eluyente fueron empleados 3 mL de una solución 50:50 de acetato de etilo/hexano. Esto se hizo a la par con las TLC de los monómeros.

3.3 Caracterización de materiales

La evaluación y caracterización de los diferentes materiales obtenidos, se llevó a cabo por medios de las siguientes técnicas:

- ✓ Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (**FTIR-ATR**)
- ✓ Resonancia magnética nuclear de protón (**RMN-¹H**)
- ✓ Dispersión dinámica de luz (**DLS**)
- ✓ Espectrofotometría de Ultravioleta-Visible (**UV/Vis**)

3.3.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (FTIR-ATR)

Para evaluar la pureza de los monómeros y sus respectivos polímeros, se realizaron lecturas mediante espectrofotometría de infrarrojo, para ello se empleó un espectrómetro modelo Nicolet iS5 de la marca Thermo Scientific que se muestra en la **Figura 14**, ideal para la docencia, polímeros y productos farmacéuticos.



Figura 14. Espectrómetro modelo Nicolet iS5 marca Thermo Scientific.

Para el análisis el detector fue limpiado previamente con acetona, una vez evaporado el solvente, se realizó un blanco mediante un barrido para eliminar la humedad y el CO₂ presente en el ambiente, posterior a esto, con ayuda de una espátula se procedió a poner la cantidad necesaria para cubrir el detector del producto estudiado y se bajó la punta de diamante hasta el tope, se realizó un barrido de 16 lecturas y se obtuvieron los espectros de IR para cada uno de los productos obtenidos.

3.3.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H)

Para evaluar la pureza de los monómeros se les realizó RMN-¹H después de purificarse, para ello se disolvieron 25 mg de cada monómero individualmente, y se agregaron a cada tubo de RMN por separado, una vez los monómeros en su respectivo tubo etiquetado, se procedió a agregar 0.6 mL de cloroformo deuterado o DMSO deuterado a cada tubo. Para evitar problemas con la solubilización, se procedió a poner todos los tubos en vortex. Finalmente fueron analizados en un equipo Spinsolve® 60 de la marca Magritek del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías que se muestra en la **Figura 15**, el cual tiene un imán

de 60 MHz, este equipo es capaz de proporcionar espectros de RMN en 1D y 2D rápidamente y de muy buena calidad, tiene como ventaja que no requiere de enfriamiento por gases, tiene una alta resolución y alta sensibilidad. Es muy útil para el estudio de moléculas pequeñas y por lo tanto ideal para los monómeros con los que se trabaja en el laboratorio de biofarmacia. Se tuvo la ventaja de trabajar de igual forma con el equipo de RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz (**Figura 16**) del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana.



Figura 15. Espectrómetro Spinsolve® 60 marca Magritek con capacidad de núcleos ^1H , (© Magritek Ltd 2013 – 2015).



Figura 16. RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz.

3.3.3 Determinación de peso molecular por dispersión dinámica de luz (DLS)

Se realizó la determinación del peso molecular de los polímeros por dispersión de luz dinámica (DLS). Para ello se prepararon 3 soluciones, las cuales se obtuvieron diluyendo los polímeros individualmente en metanol anhidro a las siguientes concentraciones de: 300 $\mu\text{g/mL}$ (3000 $\mu\text{g} = 3 \text{ mg}$ en 10 mL), 700 $\mu\text{g/mL}$ (7000 $\mu\text{g} = 7 \text{ mg}$ en 10 mL) y 1 mg/mL (10 mg en 10 mL).

Se aforaron los matraces volumétricos de 10 mL con metanol anhidro y se filtraron con acrodiscos de poro 0.45 μm , para realizar la medición el polímero debe ser soluble y estar libre de polvo ya que afecta a los parámetros del equipo, el cual es un Malvern Zetasizer Nano ZS, que se muestra a continuación:

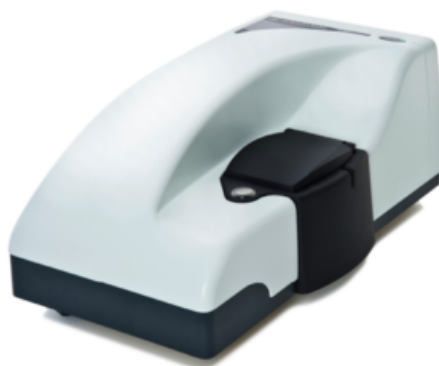


Figura 17. Malvern Zetasizer Nano ZS.

Se leyó primeramente 1 mL de tolueno como solución estándar, después 1 mL de metanol anhidro como blanco y finalmente las tres soluciones, de la más diluida a la más concentrada.

Con las muestras leídas a diferentes concentraciones se genera un gráfico de Debye el cual mostrará una intersección, indicando el peso molecular aproximado de la muestra en daltons.

3.3.4 Barridos por espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV/Vis)

Se les realizaron barridos desde la región ultravioleta hasta la región visible, en el espectrofotómetro DR6000 (**Figura 18**), para evaluar los picos máximos de absorción de cada material con lo que se trabajó, se le realizó barrido a los tres polímeros, tres monómeros y tres principios activos, para ello, se tomó 1 mg de cada material y se solubilizó en 1 mL de etanol, en eppendorf y se agitó en vórtex durante 1 min, en caso de que las absorbancias fueran mayor que 1, se procedió a hacer diluciones y el rango de longitud de onda fue desde los 190 hasta los 700 nm.



Figura 18. Espectrofotómetro DR6000 marca Hach.

3.4 Estudio hidrolisis-liberación y detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

3.4.1 Generación de comprimidos

Una vez secos los polímeros, se procedió a pulverizarlos y pesar cantidades de 50 mg. Se utilizó una matriz de 13 mm de diámetro y empleando una prensa Carver (**Figura 19**), se procedió a obtener nueve comprimidos de cada polímero mediante compresión directa con una fuerza de compresión de 3000 Kg.

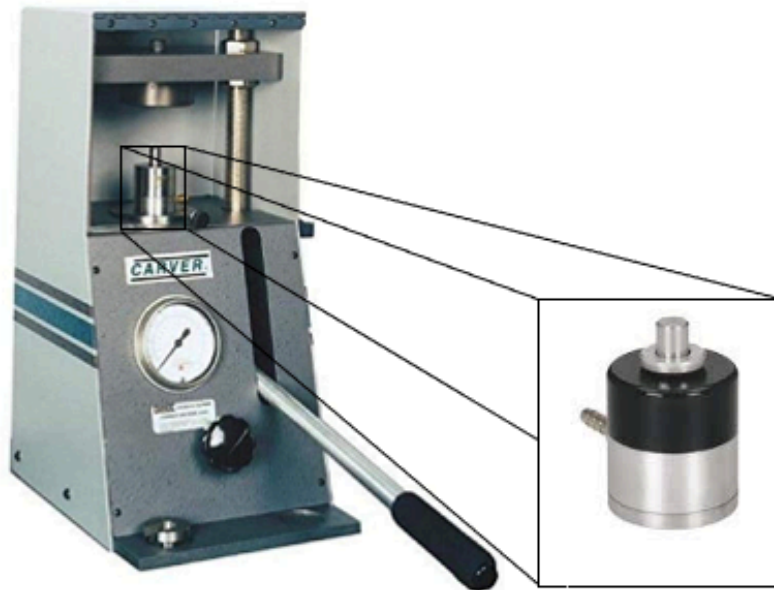


Figura 19. Prensa Carver y matriz de 13 mm de diámetro.

3.4.2 Estudio hidrolisis-liberación

Para el estudio de hidrolisis-liberación primeramente se elaboraron los medios fisiológicos simulados:

Preparación solución NaOH 0.1 N: Para la preparación de la solución 0.1 N, se disolvieron 1.9999 g de NaOH en 100 mL de H₂O purificada en el matraz, posteriormente se mantuvo en agitación constante hasta que desaparecieran las partículas y se agregó agua destilada hasta 500 mL.

$$M = \frac{g/PM}{L} \text{ debido a que NaOH tiene un factor de 1, } M = N \text{ por lo que } 0.1 N = \frac{g_{NaOH}/PM_{NaOH}}{0.5 L}$$

$$Despejando tenemos que g_{NaOH} = (0.1 N)(0.5 L)(PM_{NaOH})$$

$$g_{NaOH} = (0.1 N)(0.5 L)(39.9997 \text{ g/mol}) = 1.9999 \text{ g NaOH en 500 mL de agua destilada}$$

Preparación solución NaOH 0.2 N: Para la preparación de la solución 0.2 N, se disolvieron 3.9999 g de NaOH en 100 mL de H₂O purificada en el matraz, posteriormente se mantuvo en agitación constante hasta que desaparecieran las partículas y se agregó agua destilada hasta 500 mL.

$$M = \frac{g/PM}{L} \text{ debido a que NaOH tiene un factor de 1, } M = N \text{ por lo que } 0.2 N = \frac{g_{NaOH}/PM_{NaOH}}{0.5 L}$$

$$Despejando tenemos que g_{NaOH} = (0.2 N)(0.5 L)(PM_{NaOH})$$

$$g_{NaOH} = (0.2 N)(0.5 L)(39.9997 \text{ g/mol}) = 3.9999 \text{ g NaOH en 500 mL de agua destilada}$$

Preparación pH = 1.2: Se disolvieron 2 g de NaCl en 750 mL de H₂O desionizada en agitación, posteriormente se agregaron 7 mL de HCl concentrado y finalmente agua suficiente para completar 1 L y se procedió a medir el pH con un potenciómetro. Cuando fue necesario el pH se ajustó a 1.2 con una solución 0.1 N de HCl.

Preparación pH = 6.8: Se disolvieron 6.8 g de fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄) en 250 mL de H₂O desionizada, posteriormente se agregaron 77 mL de solución NaOH 0.2 N y finalmente agua suficiente para completar 1 L. Cuando fue necesario el pH se ajustó a 6.8 con una solución 0.1 N de NaOH.

Preparación pH = 7.4: Se disolvieron 6.8 g de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) en 250 mL de H_2O desionizada, posteriormente se agregaron 190 mL de solución NaOH 0.2 N y finalmente agua suficiente para completar 1 L. Cuando fue necesario el pH se ajustó a 7.4 con una solución 0.1 N de NaOH.

Para el estudio de hidrolisis-liberación se pesó cada comprimido y se anotó su peso inicial. Se transferieron individualmente a membranas de diálisis (por triplicado) que contenían 5 ml de buffer pH 1.2 o buffer de fosfatos pH 6.8 o pH 7.4, dependiendo de la prueba. Se transfirieron individualmente las membranas a recipientes con 45 mL del buffer empleado.



Figura 20. Oscilador VWR Shel Lab con temperatura controlada.

Se realizó la liberación con agitación de 40 rpm y a 37 °C utilizando un oscilador VWR Shel Lab (**Figura 20**) con temperatura controlada; tomando 1 mL de medio a diferentes intervalos de tiempos 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 1 h 30 min, 2 h, 2 h 30 min, 3 h, 3 h 30 min, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h (mezclando suavemente para garantizar una concentración homogénea

en el medio), el cual fue guardado en eppendorf y al medio se le reponía 1 mL por cada vez que se tomaba la muestra. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.4.3 Método de análisis para cuantificación de ácido *o*-hidroxibenzoico, ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico libre de los comprimidos por CLAR

El método empleado para la detección de los principios activos liberados de los tres polímeros con los que se trabajó en este proyecto, consistió en un método ya existente, sustraído de la undécima edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para la detección de ácido salicílico libre a partir de tabletas de ácido acetilsalicílico; con varios cambios en cuanto a condiciones, el pH de la fase móvil que nos indica la FEUM es de 3.4, la solución de dilución es 99:1 acetonitrilo y ácido fórmico, la columna empleada para su método es una columna 300 mm x 4 mm, mientras que en nuestro caso se empleó una 250 mm x 4.6 mm Hypersil GOLD, la longitud de onda si fue la misma, 280 nm para el caso del AOH, ya que coincidía con la literatura y en pruebas fue la que mejores picos arrojó, para el caso del AMH se empleó la longitud de onda 288 nm, ya que en los barridos UV-Vis realizados, mostraba un espectro de absorción similar al AOH y para el caso del APH, en base al barrido UV-Vis que se le realizó y lo encontrado en la literatura (da Graça Campos & Markham, 2007; Sietmann et al., 2010), se seleccionó la longitud de onda de 245 nm (Guo, He, Gu, Liang, & Smith, 2012). La temperatura del horno y eventualmente la columna, fue de 45 °C. Finalmente, el flujo fue algo que se modificó de igual forma, ya que la FEUM sugería un flujo de 2 mL/min y se ajustó a 1.2 mL/min.



Figura 21. Cromatógrafo Ultimate 3000 de la marca Thermo Scientific.

Las modificaciones en las preparaciones de soluciones, se muestran a continuación:

Preparación de fase móvil: La fase móvil está compuesta por una mezcla de una solución de 1-heptanosulfonato de sodio a pH 3.5 y acetonitrilo en una proporción 70:30.

Para su preparación se disolvieron 0.8 g de 1-heptanosulfonato de sodio en aproximadamente 150 mL de agua, para posteriormente ser transferidos a un matraz volumétrico de 500 mL para ser aforado a volumen (aprox. 6.5 de pH). Se ajustó el pH de esta solución a 3.5 ± 0.05 con ácido acético glacial (agregar solo una gota, baja drásticamente el pH). Finalmente se filtró y desgasificó usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro.

Por aparte se filtraron y desgasificaron 500 mL de acetonitrilo, usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro. Finalmente se agregó en el reservorio A la solución a pH 3.5 y en el reservorio B el acetonitrilo.

Preparación de solución de dilución: La solución de dilución está compuesta por una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (97:3). Se procedió a preparar un volumen final de 500 mL, para ello se midieron 485 mL de acetonitrilo y 15 mL de ácido fórmico. Se filtró y desgasificó usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro.

Preparación de las muestras: Se tomaron 700 μL de las muestras de las liberaciones, agitando previamente los viales en vórtex por 1 min y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1 mL, al cual se le agregaron 300 μL de la solución de dilución, se agitó en vórtex durante otro minuto. Se filtraron con acrodiscos de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro en un vial para CLAR de 1 mL

Para las pruebas piloto del método se prepararon las siguientes soluciones:

Solución 1: Se pesaron el equivalente a 4 ± 1 mg de estándar de ácido *o*-hidroxibenzoico, ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico, se transfirieron a matraces volumétricos de 10 ml individualmente, se disolvieron con 5 mL de solución de dilución y se agitaron con vórtex por 30 segundos, finalmente se aforaron con solución de dilución.

Solución 2: Se tomaron 0.8 mL de la solución anterior, se transfirieron a otros matraces volumétricos de 10 mL y se aforaron con solución de dilución (32 $\mu\text{g/mL}$). Se agitó con vórtex por 30 segundos. Se tomaron 1 mL de estas soluciones y se filtraron con acrodiscos de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro en un vial para CLAR de 1 mL.

3.4.4 Detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

Para la obtención de los espectros de masas se empleó la técnica de ionización por impacto electrónico, utilizando un cromatógrafo de gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo Thermo Scientific modelo ISQ LT (Figura 22).



Figura 22. Cromatógrafo de gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific modelo ISQ LT.

La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C y la de la fuente de iones 240 °C. La temperatura del inyector fue de 250 °C. La temperatura del horno fue de 120 °C, comenzando la rampa de calentamiento de la columna manteniendo esta temperatura por 1 min, para subir a una velocidad de 40 °C/min hasta 280 °C, y manteniendo esta temperatura 10 min. Se usó helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min.

Para la muestra se tomaron 2 mL del medio de liberación a pH 7.4 de los tres polímeros liberados, para esto, individualmente, en un vaso de precipitado con agitación constante, se llevaron las

soluciones hasta pH 1.2 y posteriormente se extrajeron los principios activos liberados con un embudo de separación y éter etílico como fase orgánica. Una vez terminada la extracción, se dejaron en campana para la evaporación del solvente, una vez completa la evaporación, se procedió a resuspender el producto en metanol. Esta solución se filtró empleando un acrodisco de 0.45 μ m y se agregó 1 mL a un vial ND9 de rosca corta para inyectarla en el cromatógrafo.

3.5 Rectas de calibración por CLAR

3.5.1 Recta de ácido *o*-hidroxibenzoico (AOH) en pH 7.4

Para preparar la solución stock se siguió el siguiente procedimiento: Se pesaron 10 mg de AOH, posterior a esto se agregaron 5 mL de buffer, al matraz de 25 mL y se agregó el AOH al mismo matraz esto se agito en vórtex, posteriormente se agregó buffer hasta próximo al aforo por las paredes del matraz para asegurar la totalidad del AOH en la solución y mejorar su disolución. Se colocó el matraz a sonicar por 10 min, para asegurar la disolución de la partícula, al finalizar los 10 minutos se aforó el matraz.

Finalmente se prepararon matraces volumétricos de 10 mL con las concentraciones mostradas en la **Tabla 5** y se leyeron en un Cromatógrafo Ultimate 3000 de la marca Thermo Scientific (**Figura 10**). Para los otros dos principios activos (AMH y APH) y para los diferentes pH's (1.2 y 6.8) la metodología fue la misma.

Tabla 5. Concentraciones para la preparación de recta de calibración: AOH pH 7.4 mediante CLAR.

Solución Stock o Madre AOH

10 mg /25 mL = [0.4 mg/mL]

3 125 µL de sln. madre aforados a 50 mL = [0.025 mg/mL]

Volumen del Matraz para Recta de Calibración

10 mL

Concentración
(µg/mL)

Concentración
[mg /mL]

Alícuota
(ml)

Microlitos
(µL)

Buffer
(ml)
Para 7 mL

SD
ACN:AF
(ml)

Absorbancia

1.15

0.00115

0.46

460

6.54

3

~ mAU

3.3

0.0033

1.32

1320

5.68

3

~ mAU

10

0.01

4

4000

3

3

~ mAU

25

0.025

7

10000

0

3

~ mAU

10 mg /25 mL = [0.4 mg/mL]

50

0.05

1.25

1250

5.75

3

~ mAU

100

0.1

2.50

2500

4.5

3

~ mAU

150

0.15

3.75

3750

3.25

3

~ mAU

200

0.2

5

5000

2

3

~ mAU

(λ) = 280 nm

3.6 Pruebas biológicas

3.6.1 Prueba de susceptibilidad por difusión por discos

Para poder generar pruebas de antibiograma. Se coloca individualmente los comprimidos o hidrogeles a partir de MAOB, MAMB y MAPB en una caja Petri con agar Mueller-Hinton previamente sembrada con microorganismo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginos* y *Escherichia coli*. Se incuba a 37 °C por 24 horas y luego se miden las zonas de inhibición.

Inhibición bacteriana en *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*

Para realizar pruebas piloto de inhibición bacteriana, se esterizaron 10 tubos de 10 mL con 3 mL de solución salina al 0.9 % cada uno a 121 °C por 15 min a una presión de 15 psi.

Posteriormente, se sembró por medio de la técnica de estriado múltiple, una cepa de *S. aureus* en agar nutritivo, el cual se dejó en incubación a 37 °C por 24 h. Después de 24 h, en campana se procedió a tomar 1 a 2 colonias de *S. epidermidis* con un asa desechable y se tocó el borde inferior del agua al inclinar el tubo con solución salina, depositando así las colonias en el tubo y se comparó la turbidez con el nefelómetro de McFarland al 0.5 (1.5×10^8 bacterias). Para el caso de *E. coli* se tomó media colonia y el procedimiento para depositar en el tubo con solución salina fue el mismo. Una vez ambos tubos listos se procedió a sumergir un hisopo estéril durante 5 segundos en esta suspensión y a eliminar el exceso presionándolo en las paredes del tubo (2 veces de cada lado). Se sembraron en cajas con agar Mueller Hinton mediante estriado (muy fino, horizontal, vertical y diagonal) para que creciera en masa, se sembraron los comprimidos y se etiquetaron bien las cajas. Se evaluó a 24 h y 48 h a partir de la siembra de los comprimidos.

Inhibición bacteriana en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*

Se re sembraron colonias de cultivos proporcionados por la Dr. Lili Hurtado de las cepas mencionadas. En agar nutritivo (AN) se sembraron *E. coli* y *S. aureus* y en agar sabouraud se sembró *Candida albicans*, se dejaron a 37 °C durante un día.

Una vez pasadas las 24 h, se trabajó en campana de flujo laminar, se tomó un tubo de 10 mL con 3 mL de solución salina al 0.9 % estéril y se procedió a tomar 1 a 2 colonias de *S. aureus* con un asa desechable y se tocó el borde inferior de la solución salina al inclinar el tubo con solución salina, depositando así las colonias en el tubo y se comparó la turbidez con el nefelómetro de McFarland al 0.5 (1.5×10^8 bacterias). Para el caso de *E. coli* y *C. albicans* se tomó media colonia y el procedimiento para depositar en el tubo con solución salina fue el mismo. Una vez los tubos

listos se procedió a sumergir un hisopo estéril durante 5 segundos en el tubo con la dilución, para eliminar el exceso se fue resionando contra las paredes del tubo 1 (2 veces de cada lado).

Se sembraron en cajas con agar Mueller Hinton mediante estriado múltiple (muy fino, horizontal, vertical y diagonal) para que creciera en masa, se colocaron los comprimidos y se etiquetaron bien las cajas. Se evaluó a 24 h y 48 h a partir de la colocación de los comprimidos.

3.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) en placa de 96 pocillos en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

Primeramente, se elaboró el medio en el laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías, para esto se empleó un medio deshidratado de infusión de cerebro corazón (ICC) de la marca BDBioxon, que de acuerdo a sus instrucciones de uso se usan 37 g para la preparación de 1 L de caldo, como se prepararon solo 100 mL, se pesaron solo 3.7 g de medio, posterior a esto se midieron 100 mL de agua destilada, la cual se agregó al matraz y posterior a esto se agregaron los 3.7 g de medio deshidratado. Se armó el sistema, se selló el matraz con el tapón y se puso a calentar con agitación manual constante, hasta hervir (15 min aproximadamente), una vez terminado esto se dejó enfriar y se midió el pH, el cual estaba a pH 7. Posteriormente, se sembró por medio de la técnica de estriado múltiple, una cepa de *S. aureus* en agar nutritivo, el cual se dejó en incubación a 37 °C por 24 h. Se esterilizaron 30 tubos Eppendorf, 6 tubos de rosca, el caldo ICC y una caja de puntillas de 200 µL y otra de 1000 µL para usarlas al día siguiente.

Antes de trabajar en con la cepa bacteriana, se prepararon tres viales para preparar tres soluciones stock de 2000 µm/mL (2 mg/mL) de cada uno de los polímeros. Para ello se pesaron 2 mg de cada polímero los cuales fueron puestos en viales y esterilizados con UV durante 30 min.

Se inició con la preparación de la suspensión de *S. aureus*, con una turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland, se procedió a tomar 1 a 2 colonias de *S. aureus* con un asa desechable y se tocó el borde de la solución salina del tubo al inclinarlo, depositando así las colonias en el tubo y se comparó la turbidez con el nefelómetro de McFarland al 0.5 (1.5×10^8 bacterias).

Posteriormente se agregaron 50 μL de DMSO a cada vial para las soluciones stock de los polímeros y se agitó bien para la incorporación de los polímeros, se le agregaron 950 μL de caldo ICC (lentamente con agitación) y se aplicó vórtex por 5 min. Seguido a esto, se agregaron 50 μL más de DMSO y otros 950 μL de caldo ICC para un volumen final de 2000 μL y se aplicó vórtex por otros 5 min.

Se inició con la dilución de la solución stock de poli(MAOB), para ello, se procedió a tomar 7 tubos Eppendorf estériles, ya que se trabajaría con 6 concentraciones (1mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625 mg/mL y 0.03125 mg/mL) y 1 más para el control de DMSO al 1%. Se procedió a agregar 500 μL de caldo ICC en cada tubo Eppendorf estéril y se etiquetaron. Posteriormente se tomaron 500 μL de la solución stock y se agregaron al tubo Eppendorf (1mg/mL), se mezcló bien y se tomaron 500 μL de esta mezcla y se transfirieron al tubo Eppendorf 2 (0.5 mg/mL), este paso se repitió hasta el tubo Eppendorf 6 (0.03125 mg/mL), el cual se quedó con 1 mL de volumen., este proceso se repitió con la solución stock de poli(MAMB) y poli(MAPB).

En la placa de 96 pocillos estéril, se agregaron 50 μL de las diluciones como se muestra en la **Figura 23** y finalmente se agregaron 50 μL de la suspensión 0.5 McFarland de *S. aureus* a todos los pocillos excepto a la fila G de los controles negativos, la fila H que solo contenía caldo se le agregó solución 0.5 McFarland, sería nuestro control positivo (1-9 H) y la columna 12 sería caldo y a esta se le agregan 50 μL de solución estéril, como control del caldo.

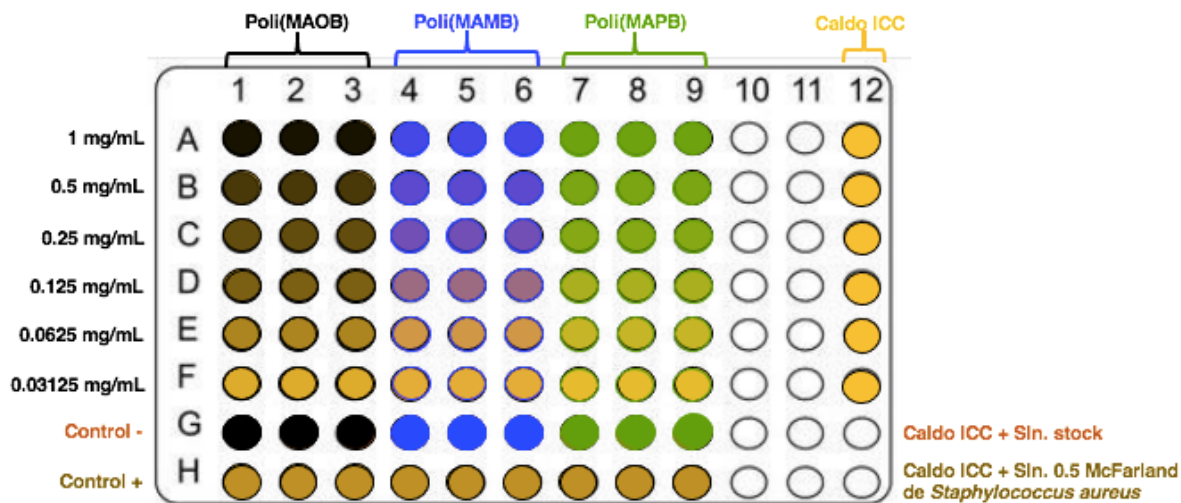


Figura 23. Esquema general de las pruebas de CMI, se muestran la ubicación de los controles y diluciones en la placa, además de las concentraciones finales de cada pocillo después de las diluciones.

Esta metodología se empleó igualmente para las cepas de *E.coli* y *P. aeruginosa*.

3.6.3 Ensayo de MTT para evaluación de citotoxicidad

En las pruebas de citotoxicidad se evaluó la citocompatibilidad determinando la viabilidad celular en cultivos celulares de fibroblastos de ratón BALB/3T3 (ATCC CCL - 163) a los que se le adicionó los polímeros.

Para ello, primeramente, se descongelaron células en un baño de agua a 37 °C, durante máximo 2 minutos y se descontaminó el tubo rociándole alcohol al 70 %. Se transfirió el contenido a un tubo cónico con 9 mL de Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) y se centrifugó a 1000 rpm por 5 min. El sedimento celular se resuspendió con DMEM y se colocó en un frasco, el cual se incubó a 37 °C por 24 h en atmosfera húmeda al 5% de CO₂.

En el segundo día, se realizó un cambio de medio, para esto, se procedió a retirar el medio de la botella con previo crecimiento celular y se procedió a agregar 3 mL de DMEM, posteriormente se incubó a 37 °C por 24 h en atmosfera húmeda al 5% de CO₂.

En el tercer día, se realizó el conteo celular, el agregado de células a placas de 96 pocillos y el pasaje de células para mantener una cantidad de células para futuros experimentos.

Para el conteo celular se tomó la botella, se desechó el medio de cultivo que contenía, se le realizó un lavado con 3 ml de PBS por 15 seg. con movimiento manual circular y se desechó. Se agregó 1.2 mL de solución de tripsina-EDTA al frasco y se observó las células bajo un microscopio invertido hasta que la capa de células se dispersaran (generalmente entre de 3- 5 min). Se agregaron 5 mL de DMEM y con la misma pipeta, se realizó una dispersión de células de manera suave. Se colocó el volumen obtenido en un tubo cónico y se procedió a centrifugar a 4000 rpm por 3 min. Se aspiró el sobrenadante y se obtuvo un pellet de células, se agregaron 3 mL de DMEM (dependiente de la confluencia) y se procedió a resuspender las células. A continuación, se realizó el conteo de células, para ello se tomaron 10 μ L de la resuspensión y se mezclaron con 10 μ L de tinte azul de tripano (trypan blue). Posteriormente se tomaron 10 μ L de esta mezcla y se depositaron en una cámara de Neubauer, se observó bajo un microscopio invertido y se contaron 5 cuadrantes (4 esquinas y el central), al terminar el conteo se eliminó el cuadrante con mayor número de células y el que tenía menor número de células, se hizo un promedio de los otros 3 cuadrantes y se multiplicó por 2 (debido a el factor de dilución) y al número obtenido se le agregó “ $\times 10^4$ cel/mL”. Se requerían 5000 células en un volumen de 100 μ L por pocillo, por lo que se hizo el siguiente calculo:

$$100 \mu L \times 96 \text{ pocillos} = 9\,600 \mu L \text{ que se redondeo a } 10\,000 \mu L (10 \text{ mL})$$

para tener medio con células extra.

Si se quieren 5000 cel por 100 μ L, se tendrían que tener 50 000 cel en 1 mL

y por lo tanto 500 000 cel en 10 mL

Si se tuvieran 204×10^4 cel/mL, el cálculo se realizaría de la siguiente manera:

Con esto en mente se hizo una regla de tres $\frac{(10 \text{ mL}) \left(50\,000 \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right)}{2\,040\,000 \frac{\text{cel}}{\text{mL}}} = 0.245 \text{ mL de la}$

suspensión de células y por lo tanto **9.755 mL de DMEM**

Esta mezcla se realizó en campana en un tubo cónico de 10 mL, una vez, se agregaron 100 µL a todos los pocillos y se incubó a 37 °C por 24 h en atmosfera húmeda al 5% de CO₂.

Con el fin de tener células para trabajar, se realizó el pasaje a una botella T25, para esto se agregó una alícuota de 3 mL de DMEM y una alícuota de 4 gotas de la suspensión de células a dos cajas pequeñas nuevas y se incubó a 37 °C por 24 h en atmosfera húmeda al 5% de CO₂.

En el cuarto día se procedió a agregar los diferentes polímeros a la placa de 96 pocillos con células con crecimiento de 24 h, para ello, antes de trabajar con la placa, se procedió a preparar 3 soluciones stock de 2 mg/mL al 2.5% de DMSO en DMEM, para lo cual se pesaron 2 mg de cada principio activo (AS, AMH y APH), los cuales fueron puestos en viales, estos viales fueron etiquetados y esterilizados con UV durante 30 min antes de que se prepararan las soluciones.

En campana se agregaron 50 µL de DMSO a cada vial, posteriormente se agregaron 950 µL de DMEM para un volumen final de 1 mL, al no tener problemas para que se solubilizaran completamente los polímeros, ya no se agregaron 50 µL más de DMSO y se agregó 1 mL DMEM para una concentración final de 2 mg/mL manteniendo la proporción de DMSO 2.5%. Estas soluciones stock, se filtraron con acrodiscos de 0.45 µm, las cuales fueron depositadas en 3 tubos Eppendorf estériles, individualmente. Se procedió a tomar 19 eppendorf estériles, 6 para cada principio activo (18 en total), ya que se trabajaría con 6 concentraciones (1mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625 mg/mL y 0.03125 mg/mL) y 1 más para el control de DMSO al 1%. Se procedió a poner 500 µL de DMEM en cada eppendorf estéril de los principios activos

(18 en total) y se etiquetaron. Posteriormente se tomaron 500 μL de las soluciones stock filtradas y se agregaron al eppendorf 1 (1mg/mL), se mezcló bien y se tomaron 500 μL de esta mezcla y se pasaron al eppendorf 2 (0.5 mg/mL), este paso se repitió hasta el eppendorf 6 (0.03125 mg/mL), el cual se quedó con 1 mL de volumen. Esta metodología fue la misma para los monómeros (MAOB, MAMB y MAPB) y para los polímeros (poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB)), una vez listas, se realizó el control de DMSO al 1%, para lo cual en otro tubo Eppendorf se agregaron 5 μL de DMSO más 495 μL de DMEM. Con todas las soluciones listas, se procedió a retirar le medio de los pocillos de la placa de 24 h de crecimiento, se procedió a agregar las soluciones en el siguiente orden:

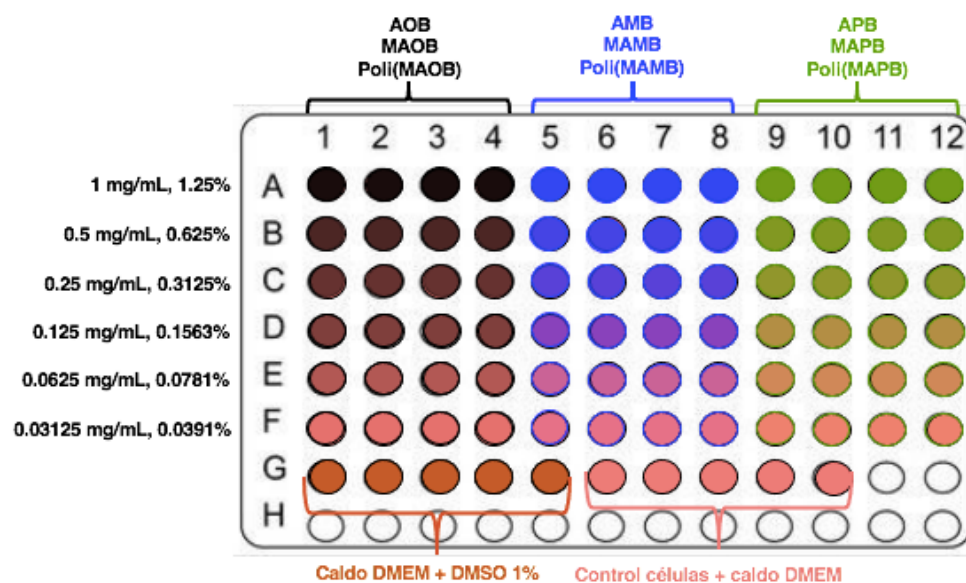


Figura 24. Esquema general de la ubicación de los controles y diluciones en la placa de 96 pocillos para la prueba de viabilidad celular, además de las concentraciones y proporciones de DMSO finales de cada pocillo después de las diluciones.

La placa se incubó a 37 °C por 24 h en atmosfera húmeda al 5% de CO_2 y la prueba se realizó por cuadruplicado con el fin de tener más datos y disminuir las desviaciones estándar; nuevamente,

esta metodología fue la misma para los monómeros (MAOB, MAMB y MAPB) y para los polímeros (poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB)).

Una vez transcurridas las 24 h, se preparó una solución 10:1 de DMEM:MTT, con la cantidad necesaria para tener 110 μL extra, si por ejemplo tuviéramos 82 pocillos y a cada uno se le agregaría 100 μL de DMEM + 10 μL de MTT, daría una solución final de 8200 μL medio de crecimiento completo + 820 μL de MTT, con los 110 μL extra, sería una solución de 8300 μL medio de crecimiento completo + 830 μL de MTT. Con la solución lista se procedió a retirar el medio de los pocillos de la placa de 24 h de crecimiento en presencia de los principios activos y controles. Se agregaron 110 μL de la solución a todos los pocillos que estuvieron en contacto con los principios activos y a los controles y se incubó a 37 °C durante 4 h en atmósfera al 5% de CO_2 , al terminar este tiempo se le agregó 100 μL de reactivo revelador y se incubó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Finalmente, en el último día se leyó la placa en la mañana a 620, 450 y 405 nm en un lector de microplacas Thermo Scientific (**Figura 25**).



Figura 25. Fotómetro de microplaca Thermo Scientific™ Multiskan™ Modelo: 51119100.

4. RESULTADOS

4.1 Síntesis y purificación de monómeros

4.1.1 Síntesis de polímeros

Se llevó a cabo el proceso acilación para dar paso a los monómeros MAOB, MAMB y MAPB (**Figura 26**) aprovechando la alta reactividad como catalizador del 4-dimetilaminopiridina (DMAP), formándose la sal de N-acilpiridinonio como par iónico altamente activo con el metacrilato, durante este paso se forma ácido metacrílico simultáneamente el cual resulta neutralizado por la trietilamina. Finalmente es activado el grupo acilo mediante deslocalización de cargas, esto permite que sea fácilmente atacado por un nucleófilo.

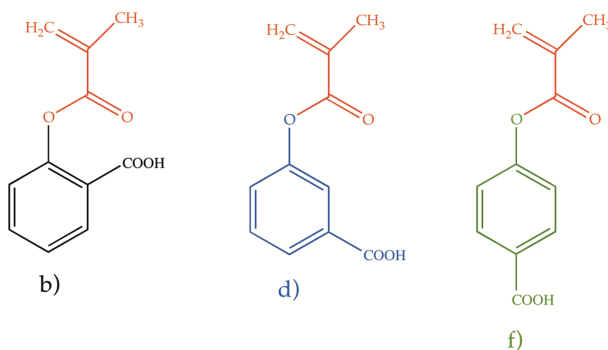
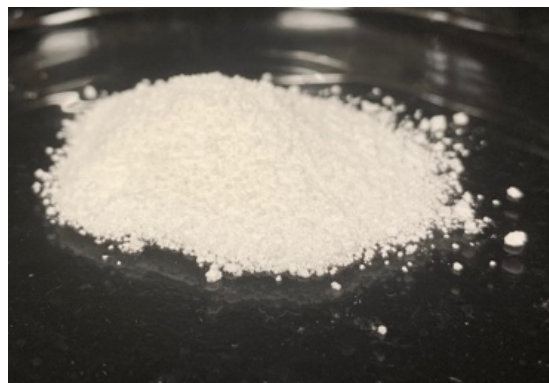


Figura 26. Estructura química propuestas del b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB.

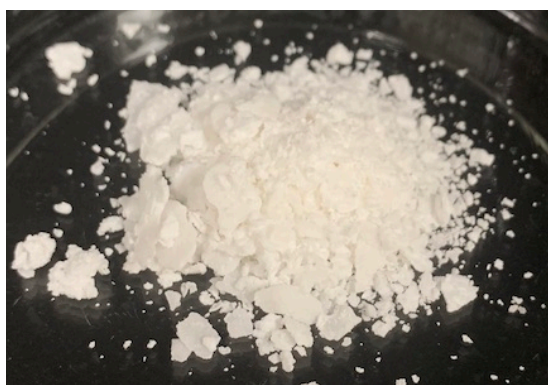
El producto obtenido para los tres casos fue un polvo blanco (**Figura 27**) y las estructuras químicas propuestas para estos monómeros son las que se muestra en la **Figura 26**, poseen un ácido carboxílico en posición *o*, *m* y *p* respectivamente y un metacrilato en posición *ipso* del anillo aromático. Observándose en este último grupo la presencia del enlace éster como grupo funcional principal reportado en la literatura e indicativo de que la reacción se llevó a cabo exitosamente.



b) MAOB



d) MAMB



f) MAPB

Figura 27. Apariencia física de los monómeros del b) MAOB, d) MAMB y f) MAPB.

Se obtuvieron los siguientes porcentajes de rendimiento para las síntesis de los monómeros mostrados en la **Tabla 6**, los cuales fueron los mejores obtenidos, mejoraron ajustando el goteo lento al agregar el anhídrido metacrílico a la reacción y controlando la temperatura a 0 °C durante el goteo.

Tabla 6. Porcentajes de rendimiento del MAOB, MAMB y MAPB.

Monómero	Rendimiento
MAOB	65 %
MAMB	86 %
MAPB	48.61 %

4.1.2 Purificación de monómeros y evaluación de pureza

Para evaluar que las purificaciones, eliminaban efectivamente impurezas o reactivo sin reaccionar, se evaluó mediante CCF y se apoyó con la técnica de RMN-¹H, ya que, al ser una técnica tan sensible, nos permitió corroborar como desaparecían picos que no integraban para ningún protón de los monómeros.

La purificación de los monómeros en posición *o* y *m*, se llevó mediante una filtración en caliente en hexano. Posterior a esto se secó el producto a 40 °C al vacío.

Para la purificación del monómero en posición *p*, se llevó mediante una filtración en caliente en hexano, seguida de una filtración con acetona. Posterior a esto se secó el producto a 40 °C al vacío.

Para evaluar la pureza de los tres monómeros se realizó una cromatografía de capa fina (CCF o TLC) antes (**Anexo 1**) y después de la purificación (**Anexo 2**). A continuación, se muestran los datos obtenidos para los diferentes monómeros antes de la purificación:

Tabla 7. Factores de retención obtenidos de las TLC del MAOB, MAMB y MAPB antes de ser purificados.

Muestra	Distancia recorrida de la muestra (cm)	Distancia recorrida del eluyente (cm)	Rf
MAOB	5.45	6.75	0.81
MAMB	5.4	6.75	0.8
MAPB	5.2	6.75	0.77

Estos datos, pueden demostrar que la diferencia en los desplazamientos se puede deber a la diferencia en la posición del ácido carboxílico en las moléculas, por el contrario, en las RMN de los monómeros mostraron algunas impurezas de baja intensidad y humedad (**Anexo 3 y 4**). En el caso del MAOB sin purificar, se detectaron señales entre 2.4-2.8 y entre 1.4-1.9 ppm consideradas como impurezas (**Anexo 3**) y el MAMB sin purificar, se detectaron señales entre 1.6-2 ppm consideradas como impurezas y/o humedad (**Anexo 4**); por lo que se les realizó la purificación a todos los monómeros y los resultados se muestran a continuación:

Tabla 8. Factores de retención obtenidos de las TLC del MAOB, MAMB y MAPB después de ser purificados.

Muestra	Distancia recorrida de la muestra (cm)	Distancia recorrida del eluyente (cm)	Rf
MAOB	4.85	6.2	0.78
MAMB	4.8	6.2	0.77
MAPB	4.65	6.2	0.75

Después de la purificación, el MAOB mostró una disminución drástica de las señales entre 1.4-1.9 y la desaparición de las señales entre 2.4-2.8 ppm, consideradas como impurezas (**Anexo 5**),

mientras que en el caso del MAMB, disminuyeron en intensidad las señales entre 1.6-2 ppm además de una mayor nitidez en las señales (**Anexo 6**). Corroborando que las purificaciones reducían drásticamente la presencia de impurezas en los monómeros.

4.2 Síntesis y purificación de polímeros

4.2.1 Síntesis de polímeros

Se llevó a cabo el proceso de polimerización de los polímeros poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB), aprovechando la alta reactividad como iniciador del AIBN, formándose el fragmento iniciador altamente activo con el doble enlace carbono-carbono del metacrilato, durante este paso es cuando inicia la polimerización en cadena mediada por radicales libres. Finalmente la reacción en cadena se detiene por el acoplamiento de dos cadenas o por la reacción con una impureza (como el oxígeno), o simplemente porque se acaba el monómero (L. J. Wade, 2012).

El producto obtenido para los tres casos fue un polvo blanco y cristalino (**Figura 30**) y sus estructuras químicas propuestas se muestran en la **Figura 28**, mantienen en posición *o*, *m* y *p* un ácido carboxílico y un metacrilato en posición *ipso* ahora sin los enlaces vinílicos, ya que los carbonos que lo poseían, forman ahora enlace con los carbonos de otros monómeros que también han perdido su enlace vinílico.

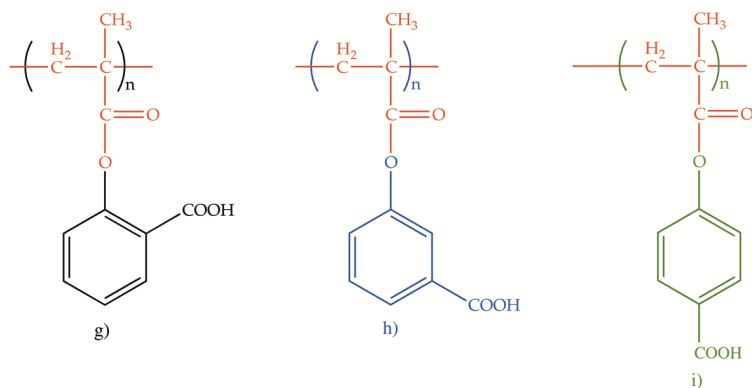
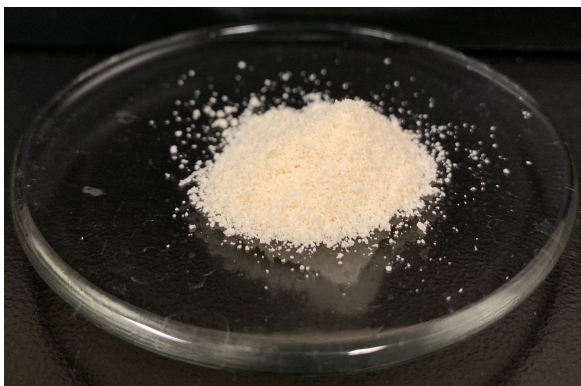


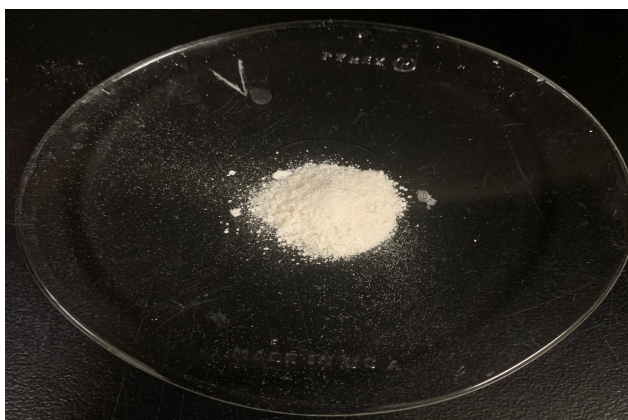
Figura 28. Estructura química propuestas del g) poli(MAOB), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB).



g) Poli(MAOB)



h) Poli(MAMB)



i) poli(MAPB)

Figura 29. Apariencia física de los polímeros g) poli(MAOB), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB).

Se obtuvieron los siguientes porcentajes de rendimiento para las síntesis de los polímeros (**Tabla 9**), estos podrían ser mejorados con el burbujeo de nitrógeno gaseoso o duplicando la cantidad de iniciador.

Tabla 9. Porcentajes de rendimiento del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB).

Polímero	Rendimiento
Poli(MAOB)	92 %
Poli(MAMB)	76 %
Poli(MAPB)	83 %

4.2.2 Purificación de polímeros y evaluación de pureza

Para evaluar la pureza de los tres polímeros se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) antes y después de la purificación. A continuación, se muestran los datos obtenidos para los diferentes polímeros antes de la purificación:

Tabla 10. Factores de retención obtenidos de las TLC del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) antes de ser purificados.

Muestra	Distancia recorrida de la muestra (cm)	Distancia recorrida del eluyente (cm)	Rf	Distancia recorrida de la impureza (cm)	Distancia recorrida del eluyente (cm)	Rf
Poli(MAOB)	0	5.9	--	3.98	5.9	0.67
Poli(MAMB)	0	5.9	--	--	5.9	--
Poli(MAPB)	0	5.9	--	2.5	5.9	0.42

Debido a que el poli(MAMB) no presentó el desplazamiento de alguna impureza no se le realizó su respectiva purificación. Para los polímeros poli(MAOB) y poli(MAPB) que si presentaron impurezas (**Anexo 6**) se llevaron a cabo sus respectivas purificaciones. A continuación, se muestran los datos obtenidos para los polímeros impuros después del proceso de purificación y contrastados con sus productos de hidrólisis:

Tabla 11. Factores de retención obtenidos de las TLC del poli(MAOB) purificado, AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), poli(MAPB) purificado y el APH (ácido *p*-hidroxibenzoico).

Muestra	Distancia recorrida de la muestra (cm)	Distancia recorrida del eluyente (cm)	Rf	Distancia recorrida de la impureza (cm)	Distancia recorrida del eluyente (cm)	Rf
Poli(MAOB)	0	4.9	--	3.2	4.9	0.65
AOH	3	4.9	0.61			
Poli(MAPB)	0	5.75	--	2.65	5.75	0.46
APH	2.5	5.75	0.43			

Con estos últimos datos se llegó a la conclusión de que lo que estábamos tomando como posibles impurezas era el producto de hidrolisis de los respectivos polímeros, ya que los factores de retención de las impurezas eran muy similares a los factores de retención de los principios activos por sí solos.

4.3 Caracterización de materiales

La evaluación y caracterización de los diferentes materiales obtenidos se llevó a cabo por medios de las siguientes técnicas:

- ✓ Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (**FTIR-ATR**)
- ✓ Resonancia magnética nuclear de protón (**RMN-¹H**)
- ✓ Dispersión dinámica de luz (**DLS**)
- ✓ Espectrofotometría de Ultravioleta-Visible (**UV/Vis**)

4.3.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total (FTIR-ATR)

Las estructuras químicas de los monómeros presentaron las siguientes señales en el espectro de infrarrojo (**Figuras 30, 31 y 32**), una banda muy ancha de intensidad media entre 3400 a 2400 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento O-H del grupo carboxilo, una banda de intensidad media entre 3100 y 3000 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C-H de tipo vinílico y otra banda de intensidad media entre 3000 y 2850 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C-H de tipo alifático, aproximadamente a 1890-2660 cm^{-1} aparecen unas bandas de intensidades muy débiles características de los sobretonos del anillo aromático, una banda de intensidad fuerte entre 1750 y 1730 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=O del carbonilo del éster, una banda de intensidad fuerte entre 1725 y 1700 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=O del carboxilo del ácido carboxílico, una banda de intensidad media a aproximadamente 1620 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=C de tipo alifático, bandas de intensidad media entre 1600 y 1475 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=C de tipo aromático, bandas entre 1300 y 1000 cm^{-1} debido

a las vibraciones C-O del ácido carboxílico y del éster, finalmente las bandas de absorción C-H entre 900 y 690 cm^{-1} debido a la vibración de flexión fuera del plano, características de los anillos disustituídos. Cuando se trata de una *orto* sustitución se observa una banda de intensidad fuerte a aproximadamente 750 cm^{-1} , cuando se trata de una *meta* sustitución, se observan 3 bandas, una de intensidad fuerte a aproximadamente 690 cm^{-1} , otra cerca de los 780 cm^{-1} y una de intensidad media a aproximadamente 880 cm^{-1} ; finalmente, cuando se trata de una *para* sustitución, se observa una señal única de intensidad fuerte entre 850 y 800 cm^{-1} .

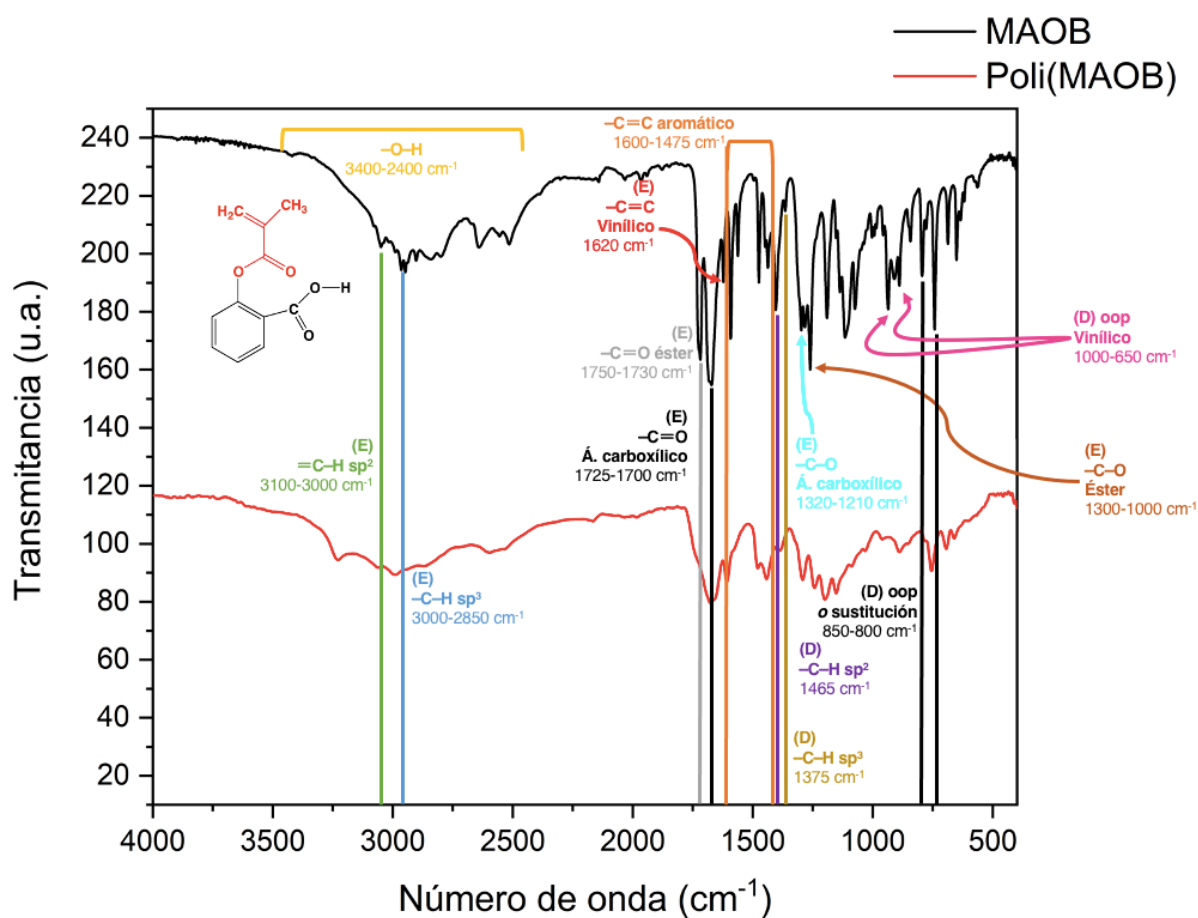


Figura 30. Espectro de FTIR del MAOB y el poli(MAOB) purificados.

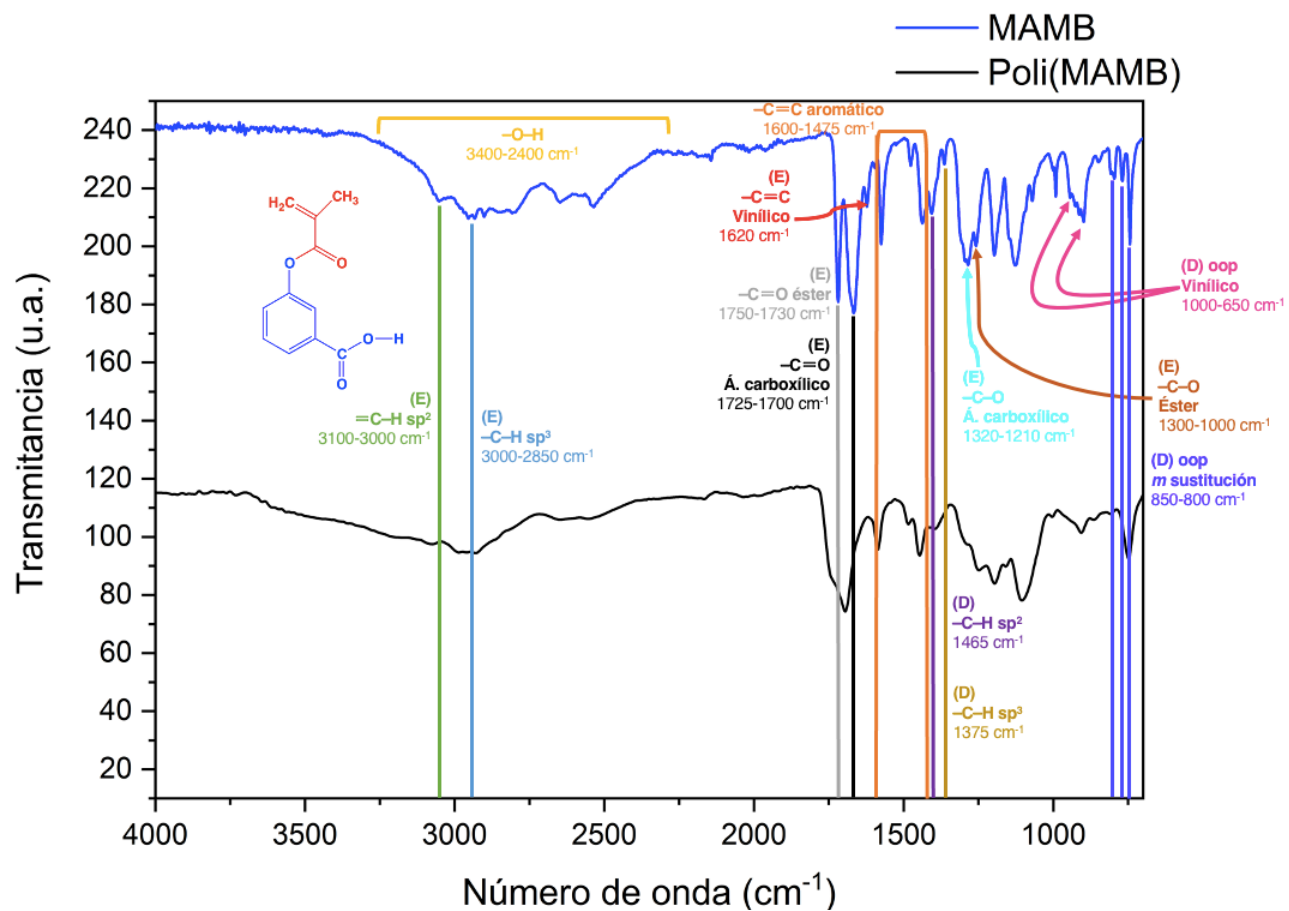


Figura 31. Espectro de FTIR del MAMB y el poli(MAMB) purificados.

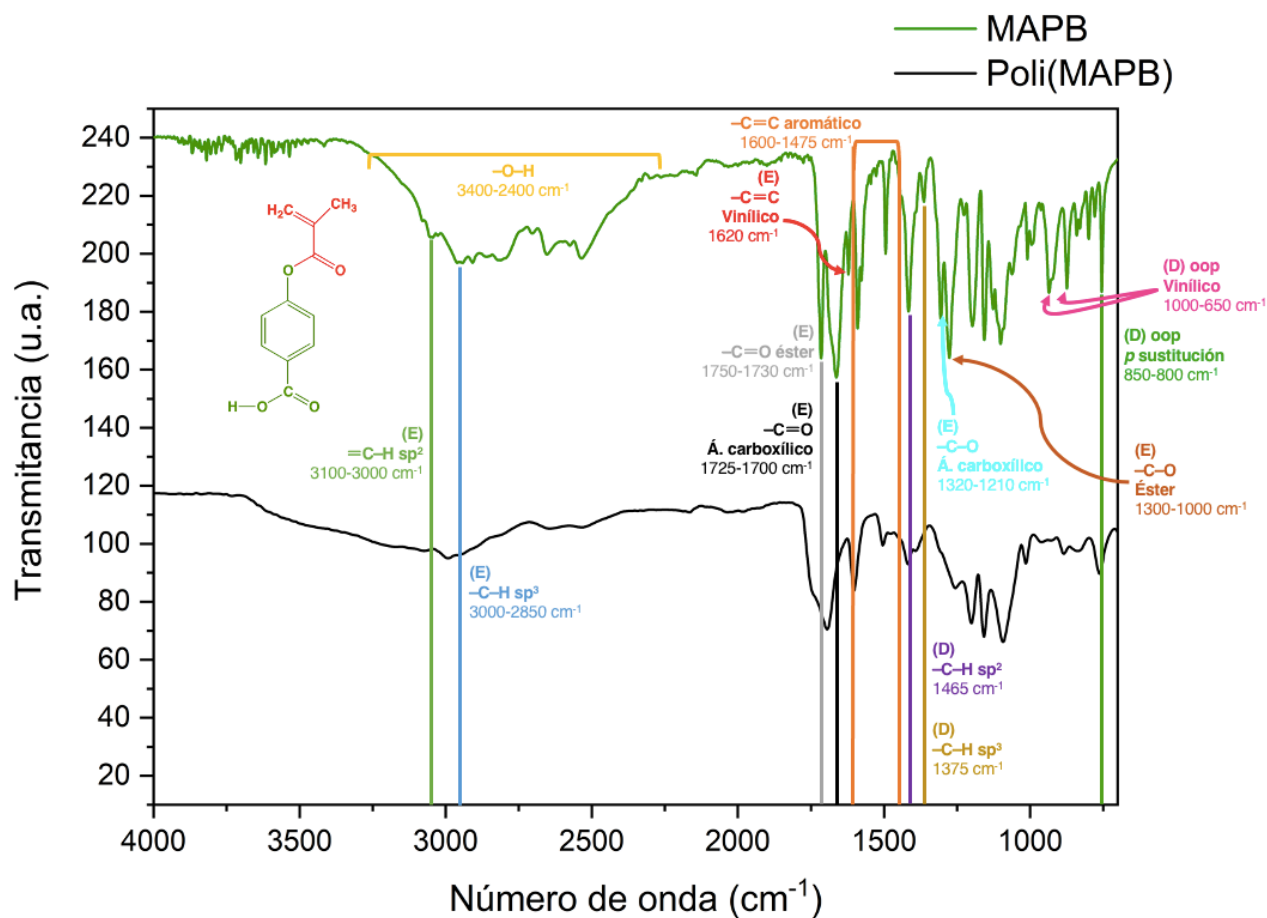


Figura 32. Espectro de FTIR del MAPB y el poli(MAPB) purificados.

Las estructuras químicas de los polímeros presentaron las siguientes señales en el espectro de infrarrojo (**Figuras 30, 31 y 32**); la misma banda ancha de intensidad media entre 3400 a 2400 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento O-H del grupo carboxilo, la banda de intensidad media entre 3100 y 3000 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C-H de tipo vinílico y la banda de intensidad media entre 3000 y 2850 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C-H de tipo alifático se engruesan y dejan de apreciarse tan claramente como en los monómeros, la banda de intensidad fuerte entre 1750 y 1730 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=O del carbonilo del éster y la banda de intensidad fuerte entre 1725 y 1700 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=O del carboxilo del ácido carboxílico se engruesan y se sobreponen, desaparece la banda de

intensidad media a aproximadamente 1620 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento C=C de tipo alifático prueba de la exitosa polimerización, bandas de intensidad media entre 1600 y 1475 debido a la vibración de estiramiento C=C de tipo aromático, se observan bandas entre 1300 y 1000 cm^{-1} debido a las vibraciones C-O del ácido carboxílico y del éster, finalmente las bandas de absorción C-H entre $900\text{ y }690\text{ cm}^{-1}$ debido a la flexión fuera del plano, características de los anillos sustituidos, las cuales también se engruesan, se sobreponen y dejan de apreciarse tan claramente como en los monómeros.

4.3.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H)

Las estructuras químicas de los monómeros presentaron las siguientes señales en sus espectros de RMN- ^1H (**Figuras 34, 35 y 36**). A un desplazamiento de aproximadamente 2 ppm se observa un singlete, que integra para 3 H, asignados a los protones del metilo (a); entre 5.70 y 6 ppm un singlete que integra 1 H, el cual es asignado al protón vinílico que se encuentra en posición *cis* con respecto al metilo (b); entre 6.30 y 6.50 ppm otro singlete que integra a 1 H, el cual es asignado al otro protón vinílico que se encuentra en posición *trans* con respecto al metilo (c); entre 7.00 y 8.30 ppm una señal múltiple en cuatro paquetes que integra para 4 H, las cuales se asignaron a los protones de la porción aromática (d, e, f y g) y finalmente entre 9.6 y 9.90 ppm un singlete ancho a 60 MHz y aproximadamente a 13 ppm a 400 MHz que integra para 1 H, asignado al protón del ácido carboxílico (h).

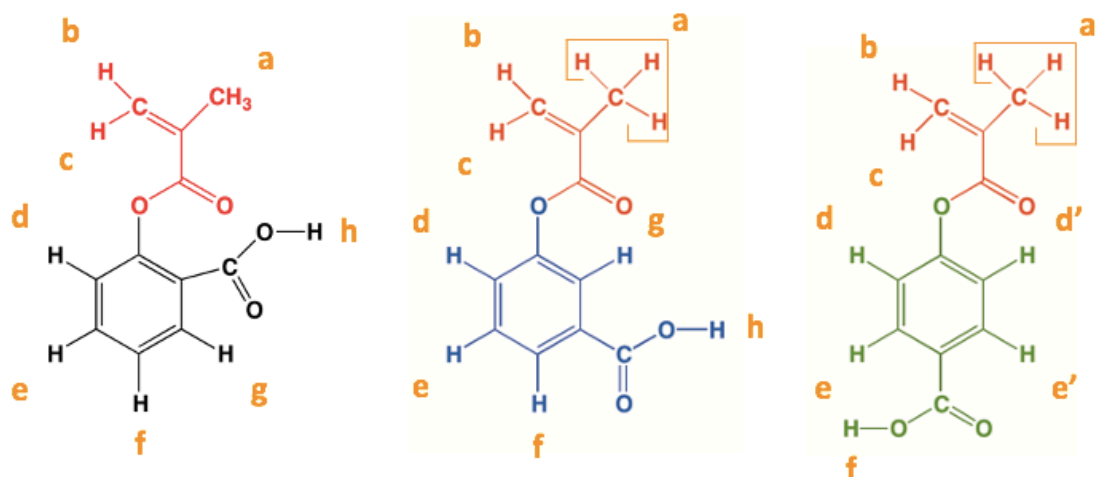


Figura 33. Monómeros MAOB, MAMB y MAPB, con la señalización de todos sus protones.

El espectro de resonancia del MAOB, concuerda con el espectro presentado por (Palazzina & Monteroni, 2006) el cual muestra lo siguiente: (CDCl₃) δ (ppm) 7.20-8.20 (m, 4H, protones aromáticos), 5.77-6.40 (m, 2H, =C=CH₂), 2.07 (s, 3H, -CH₃), a pesar de no presentar la señal del protón del ácido carboxílico en su espectro, las demás señales muestran una gran similitud de su espectro con el realizado en este trabajo.

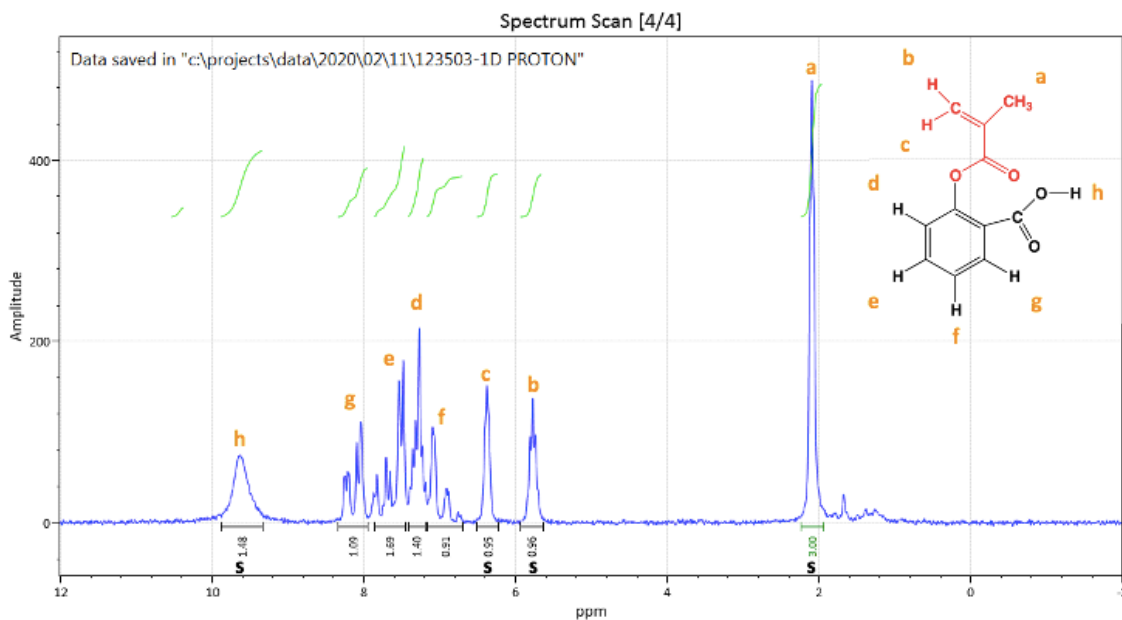


Figura 34. Espectro de RMN del MAOB en el equipo de RMN Spinsolve high de 60 MHz. (CDCl₃) δ (ppm) 9.60 (s, 1H, -COOH), 7.10-8.33 (m, 4H, protones aromáticos), 6.36 (s, 1H, =C=CH₂, trans), 5.78 (s, 1H, =C=CH₂, cis), 2.08 (s, 3H, -CH₃).

Debido a que el espectro anterior fue realizado en un equipo de 60 MHz, la región aromática no se logra apreciar el desdoblamiento adecuado de el multiplete, a pesar de esto, para el anillo aromático *orto*-sustituido, teóricamente se esperaba encontrar un multiplete de 4 señales. Yendo de campo bajo a campo alto (desprotección a protección), estaría conformado por un doblete entre 8 y 8.2 ppm aproximadamente, que integra para el protón en posición *orto* con respecto al grupo más electronegativo, en este caso el carboxilo, que sería el protón asignado con la letra g, en el espectro anterior, seguido de un triplete a aproximadamente 7.6 ppm, que integra para el protón en posición *para* con respecto al grupo carboxilo, asignado con la letra e; otro doblete entre 7.3 y 7 ppm aproximadamente, que integra para el protón en posición *orto* con

respecto al grupo más electrodonador, en este caso el éster, que sería el protón asignado con la letra d, en el espectro anterior y finalmente otro triplete, a aproximadamente 7 ppm, que integra para el protón en posición *para* con respecto al grupo éster, asignado con la letra f.

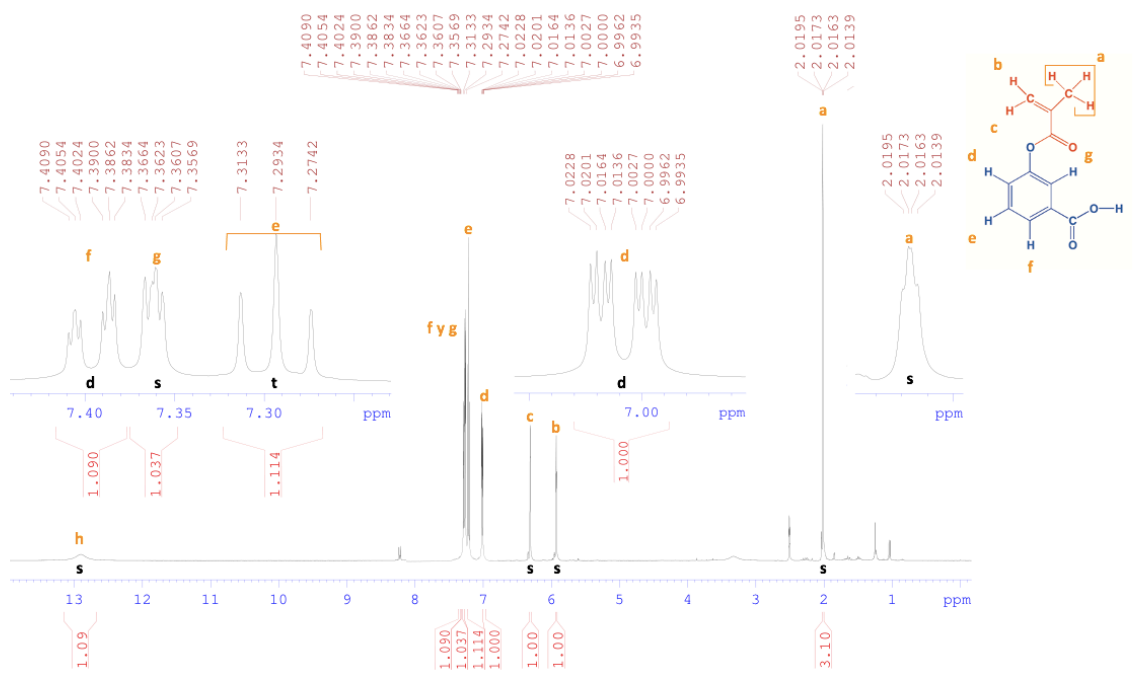


Figura 35. Espectro de RMN del MAMB en el equipo de RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz.

(DMSO-d 6) δ (ppm) 12.9 (s, 1H, -COOH), 7-7.4 (m, 4H, protones aromáticos), 6.3 (s, 1H, =C=CH₂, trans), 5.95 (s, 1H, =C=CH₂, cis), 2.01 (s, 3H, -CH₃).

En el caso de un anillo aromático *meta*-sustituido, como es el caso del MAMB, la región aromática presenta nuevamente un multiplete, en el espectro anterior se logra apreciar el desdoblamiento adecuado del multiplete, y las expansiones de cada señal. Como se espera para un anillo aromático *meta*-sustituido, se observaron 4 señales; yendo nuevamente de campo bajo a campo alto, primeramente, un doblete entre 7.4 y 7.38 ppm aproximadamente, que integra para el protón en posición *orto* con respecto al grupo más electronegativo, en este caso el carboxilo y *para* con el grupo electrodonador, que sería el protón asignado con la letra f, seguido de un singulete a

aproximadamente 7.36 ppm, que integra para el protón que se encuentra entre ambos grupos, asignado con la letra g, el más sencillo de asignar, ya que es el único sin protones vecinos, esta señal podría salir aún más desprotegida por la cercanía al carboxilo, suponemos que la cercanía del grupo éster le brinda de cierto modo un poco de protección; un triplete entre 7.31 y 7.27 ppm aproximadamente, que integra para el protón en posición *meta* con respecto a los dos grupos, que sería el protón asignado con la letra e; finalmente, otro doblete entre 7 y 6.99 ppm aproximadamente, que integra para el protón en posición *orto* con respecto al grupo más electrodonador, en este caso el éster, que sería el protón asignado con la letra d.

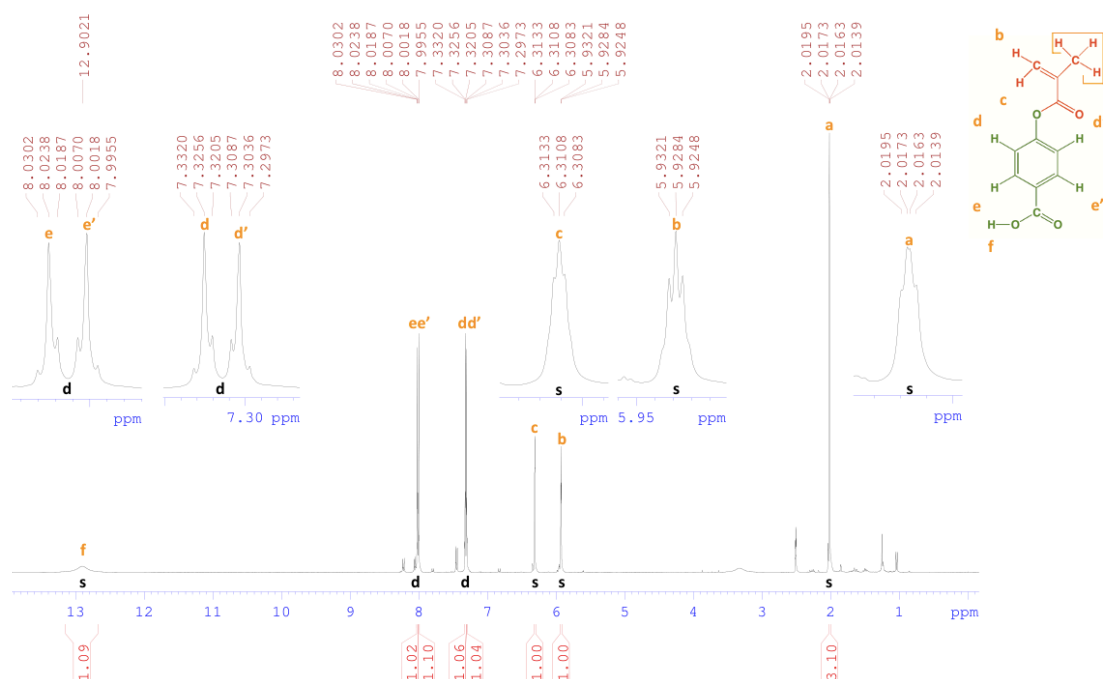


Figura 36. Espectro de RMN del MAPB en el equipo de RMN Bruker Avance III HD de 400 MHz.

(DMSO-d_6) δ (ppm) 12.9 (s, 1H, -COOH), 7.29-8 (m, 4H, protones aromáticos), 6.27 (s, 1H, =C=CH₂, trans), 5.90 (s, 1H, =C=CH₂, cis), 2.01 (s, 3H, -CH₃).

Finalmente, en el caso de un anillo aromático *para*-sustituido existe un eje de simetría, para este tipo de anillos existe un patrón característico de 4 señales, como se puede apreciar en el

espectro anterior, en el se logra apreciar el desdoblamiento adecuado de las 4 señales en la región aromática gracias a las expansiones de cada señal. El eje de simetría para el monómero MAPB, es el que se muestra en la **Figura 37**.

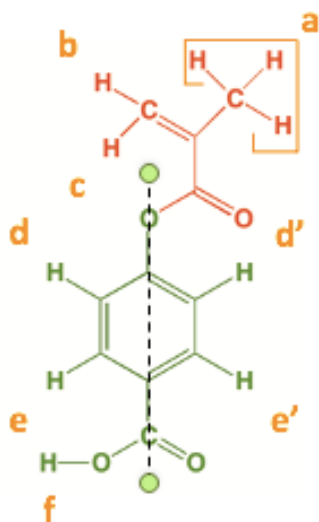


Figura 37. Eje de simetría presente en los anillos *para*-sustituídos y en el monómero MAPB.

Como se mencionó, se observaron 4 señales; yendo nuevamente de campo bajo a campo alto; primeramente, un par de dobletes entre 8 y 7.9 ppm aproximadamente, que integra para los protones en posición *orto* con respecto al grupo carboxilo, que sería los protones asignados con la letra e y e'; finalmente, otro par de dobletes entre 7.33 y 7.29 ppm aproximadamente, que integra para los protones en posición *orto* con respecto al grupo éster, que sería los protones asignados con la letra d y d'.

Es gracias a estos desdoblamientos de la zona aromática que se logra constatar, que efectivamente, se trabajó con 3 monómeros, los cuales tenían un grupo éster en la posición *ipso* y un ácido carboxílico en la posición *orto*, *meta* y *para*, con respecto al éster. Debido a que se tienen tanto un

grupo electroattractor, como uno electrodonador, las señales de la porción aromática no se desplazaron ni a campo alto, ni a campo bajo.

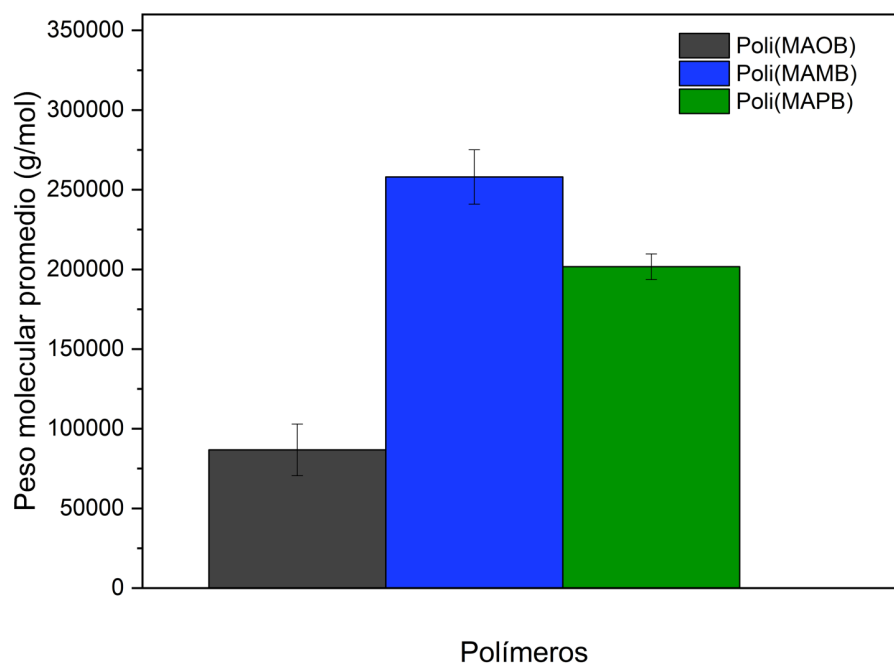
4.3.3 Determinación de peso molecular por dispersión dinámica de luz (DLS)

El peso molecular promedio de los polímeros se obtuvo mediante tres muestras leídas a diferentes concentraciones, estas lecturas generaron un gráfico de Debye el cual mostró una intersección, indicando el peso molecular aproximado de la muestra en Daltons. Los pesos moleculares obtenidos ($n = 3$) fueron los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 12. Pesos moleculares promedio del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB), Dalton (Da) y g/mol son numéricamente equivalentes, por lo que los PM son los mismos en las unidades convencionales de g/mol.

Polímero	PM (Da)
Poli(MAOB)	86 750 $\pm$ 19367
Poli(MAMB)	258 000 $\pm$ 35300
Poli(MAPB)	201 667 $\pm$ 4472

En el **Gráfico 1**, se muestran las desviaciones estándar del triplicado de cada polímero y se anexa para hacer un poco más visual la gran diferencia de tamaño que existe entre la posición *o* y las posiciones *o* y *p*, en el caso de la posición *o*, la cercanía del grupo carboxilo al grupo hidroxilo donde se lleva a cabo la esterificación puede ser la principal causa de que las cadenas sean más cortas en este polímero.



Gráfica 1. Pesos moleculares promedio del poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) con sus respectivas desviaciones estándar.

4.3.4 Barridos por espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV/Vis)

A continuación, se muestran los barridos obtenidos por los nueve materiales con los que se trabajó en este proyecto, la finalidad de estas pruebas fue observar como el cambio en la posición del ácido carboxílico en el anillo aromático, produce desplazamientos y cambios en el espectro de absorción de las moléculas, también para corroborar los datos arrojados por la literatura en cuanto a longitudes de onda a las que se absorben los principios activos liberados.

En el caso de los principios activos, de tener una concentración de 1 mg/mL en etanol, fue necesario realizar diluciones hasta tener una proporción 1:40 (0.01 mg/mL) ya que las absorbancias en la proporción 1:10 y 1:20 eran mayores a 1 en los tres principios activos.

Para el caso de los monómeros y polímeros solo fue necesaria la dilución hasta la proporción 1:20 (0.01 mg/mL).

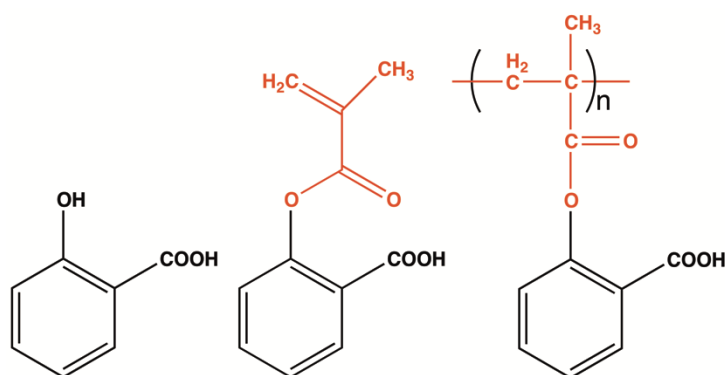


Figura 38. Estructuras químicas de el ácido *o*-hidroxibenzoico (AOH), el MAOB y el poli(MAOB).

La **Figura 39**, muestra el barrido del AOH, su monómero el MAOB y su respectivo polímero, el poli(MAOB), como se esperaba para el AOH (Edwards, 1950), todas las bandas de absorción se encontraron dentro de la región UV (100-390 nm), siendo la longitud máxima de absorción a 203 nm, muy cercano al reportado en literatura (210 nm, NCBI, 2021), que corresponde a la señal arrojada por un grupo hidroxilo formando parte de un anillo aromático en el caso del AOH y en el

caso del MAOB y el poli(MAOB) sería por el grupo éster; seguida de la banda a 230 nm (234 nm, NCBI, 2021 y 236 nm, Edwards, 1950), que corresponde a la banda máxima obtenida por un ácido carboxílico en forma no ionizada formando parte de un anillo aromático, en el caso del monómero, puede deberse a la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares que la banda no tenga una buena definición, como se observará en sus homólogos, donde se encuentra en posición *m* y *p*. Y finalmente, la banda más cercana a la región visible, a 299 (303 nm, NCBI, 2021 y 296 nm Edwards, 1950) que corresponde a la banda máxima obtenida por un ácido carboxílico en forma ionizada formando parte de un anillo aromático (Edwards, 1950).

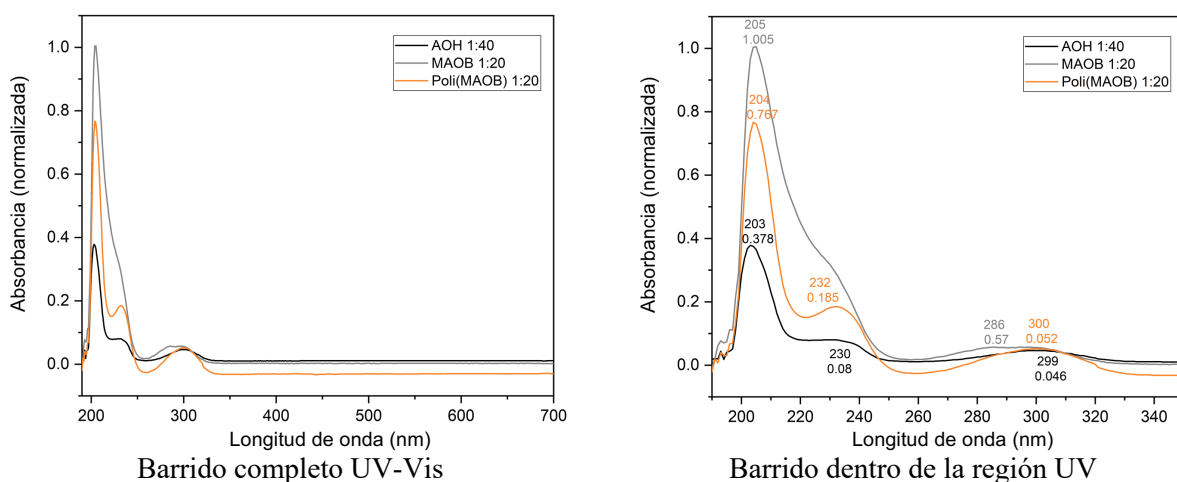


Figura 39. Espectro de absorción en la región UV-Vis de el ácido *o*-hidroxibenzoico (AOH), el MAOB y el poli(MAOB).

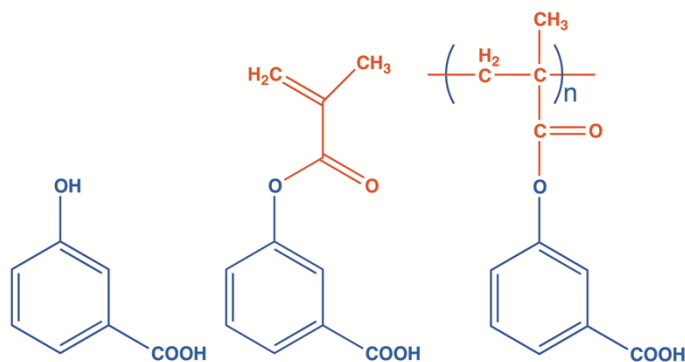


Figura 40. Estructuras químicas de el ácido *m*-hidroxibenzoico (AMH), el MAMB y el poli(MAMB).

Continuando con la **Figura 41**, que muestra el barrido del AMH, su monómero el MAMB y su respectivo polímero, el poli(MAMB), como su isómero el AOH, el AMH, también tuvo todas las bandas de absorción dentro de la región UV (100-390 nm) al igual que su monómero y su polímero, siendo la longitud máxima de absorción a los 207 nm, arrojada por un grupo hidroxilo formando parte de un anillo aromático en el caso del AMH y en el caso del MAMB y el poli(MAMB) sería por el grupo éster; seguida de la banda a 233 nm, muy cercano al reportado en literatura (231 nm, NCBI, 2021), que corresponde a la banda máxima obtenida por un ácido carboxílico en forma no ionizada, aquí al contrario de la posición *o*, se define mucho mejor la banda para el caso del monómero y finalmente, la banda más cercana a la región visible, a 296 (290 nm) que corresponde a la banda máxima obtenida por un ácido carboxílico en forma ionizada. Como la ya mencionó en la discusión de la posición *o*, debido a la lejanía del éster y el -COOH, puede deberse la falta de la banda de el -COO⁻. Al igual que como se verá en el método de CLAR, este principio activo y el AOH, tienen picos muy similares en cuanto a la longitud de onda a la que absorben.

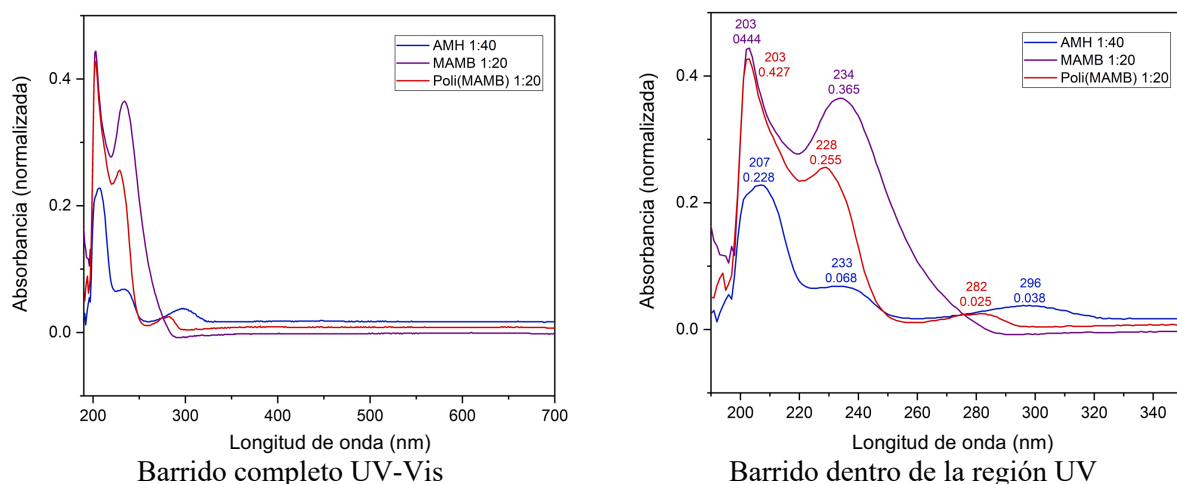


Figura 41. Espectro de absorción en la región UV-Vis de el ácido *m*-hidroxibenzoico (AMH), el MAMB y el poli(MAMB).

Finalmente, en la **Figura 43**, se muestra el barrido del APH, su monómero el MAPB y su respectivo polímero, el poli(MAPB), tuvieron los tres materiales de igual forma todas las bandas de absorción dentro de la región UV (100-390 nm), siendo la longitud máxima de absorción del APH a 201 nm, obtenida por un grupo hidroxilo formando parte de un anillo aromático en el caso del APH y en el caso del MAPB y el poli(MAPB) sería por el grupo éster; y seguida de la banda a 254 nm, muy cercano al reportado en literatura (250 nm, NCBI, 2021, 245 y 254 nm, Guo et al., 2012), que corresponde a la banda máxima obtenida por un ácido carboxílico en forma no ionizada, aquí al contrario de la posición *o*, se define mucho mejor la banda para el caso del monómero. Este desplazamiento de la banda del -COOH, en contraste con las otras posiciones, que conservaron muy similares desplazamientos, puede deberse a la lejanía del éster y el -COOH y a que se encuentra el éster en posición *para* con respecto al -COOH. El desplazamiento al rojo por *orto*-sustitución de los grupos -XH (X = N, O, S) puede originarse a partir del enlace de hidrógeno entre el grupo de sustitución y el grupo de ácido carboxílico (o carboxilato), que faltan en las sustituciones *para* (Guo et al., 2012). Al igual que como se verá en el método de CLAR, este

principio activo se leyó a una longitud de onda muy cercana a la detectada por el espectrofotómetro UV-Vis.

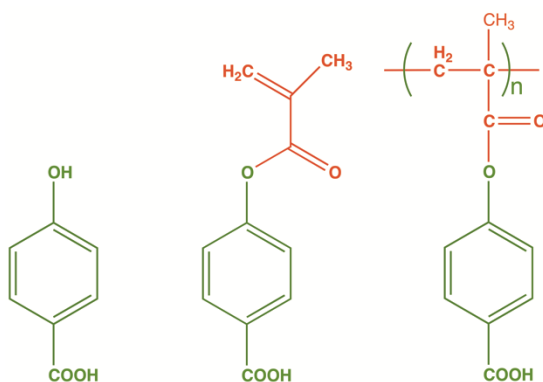


Figura 42. Estructuras químicas de el ácido *p*-hidroxibenzoico (APH), el MAPB y el poli(MAPB).

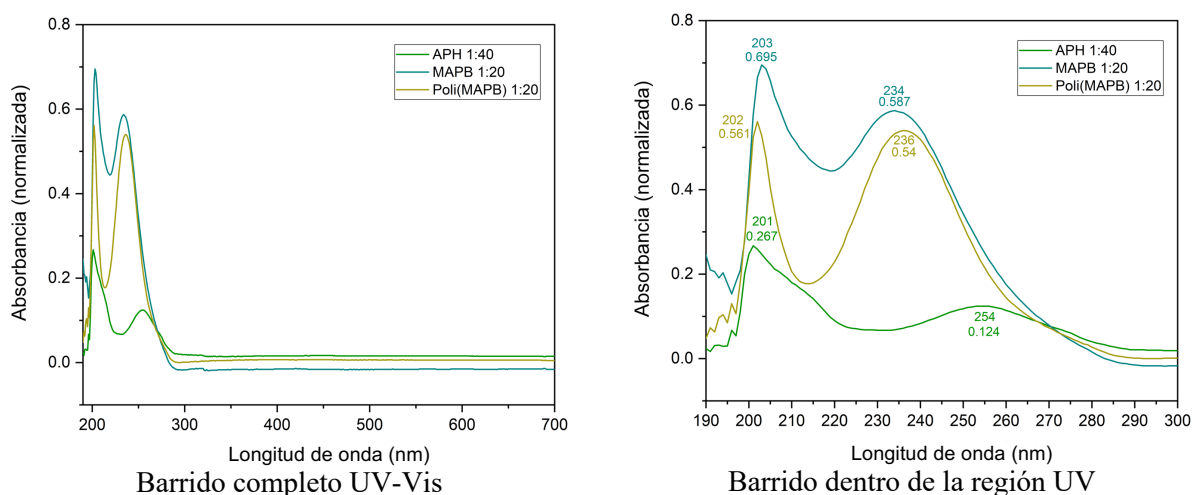


Figura 43. Espectro de absorción en la región UV-Vis de el ácido *p*-hidroxibenzoico (APH), el MAPB y el poli(MAPB).

Como se mencionó anteriormente, la banda a aproximadamente 230 nm (236 nm, Edwards, 1950), corresponde a la banda máxima obtenida por un ácido carboxílico en forma no ionizada formando parte de un anillo aromático, en el caso del monómero MAOB, puede deberse a la presencia de

puentes de hidrógeno intramoleculares que la banda no tenga una buena definición, como se observará en sus homólogos, donde se encuentra en posición *m* y *p*, **Figura 44**.

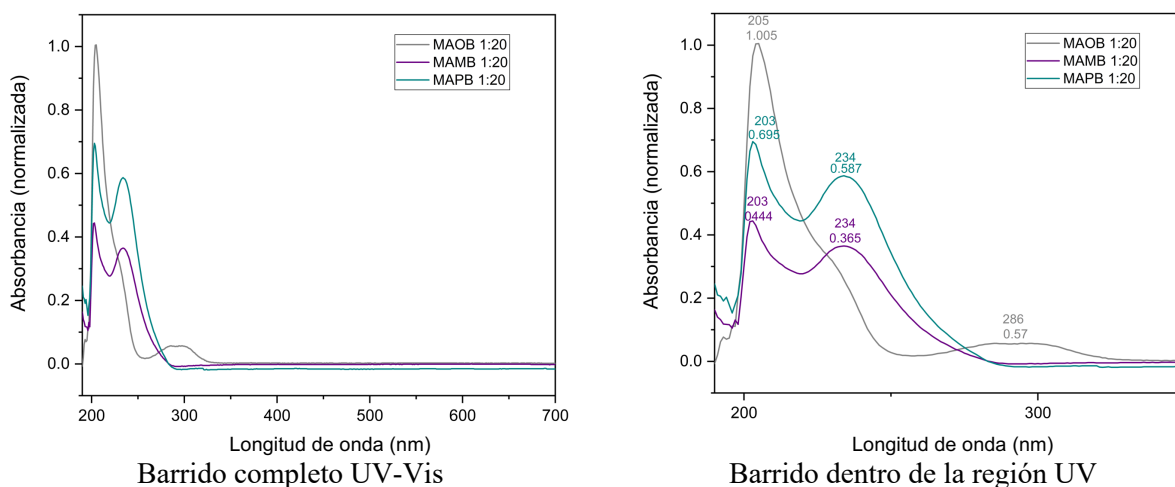


Figura 44. Espectro de absorción en la región UV-Vis de el MAOB, MAMB y el MAPB.

En el caso del MAOB, puede deberse, a la cercanía del éster y el -COOH, la aparición de la banda de el -COO⁻, ya que como se muestra en las posiciones *m* y *p*, esta última banda no aparece.

Este efecto no ocurre en el caso del poli(MAOB), en el cual, si se logra apreciar la banda a 228 nm (**Figura 45**), esto puede deberse a que, al ser una macromolécula, el grupo -COOH, es menos susceptible a ionizarse por mero impedimento estérico, a pesar de esto, existe cierta cantidad que si se ioniza ya que se logra apreciar la banda 300 nm de la especie ionizada.

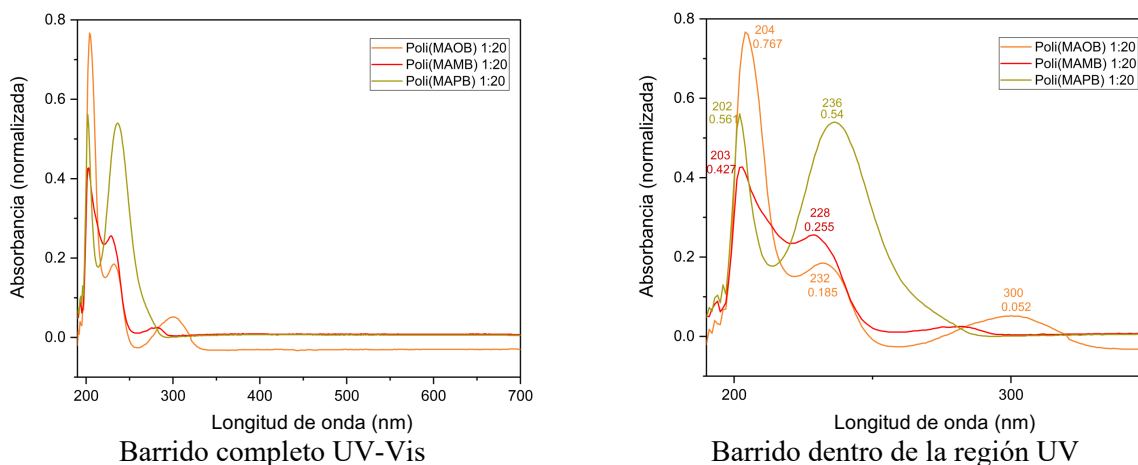


Figura 45. Espectro de absorción en la región UV-Vis de el poli(MAOB), poli(MAMB) y poli (MAPB).

4.4 Estudio hidrolisis-liberación y detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

El estudio de hidrolisis-liberación fue realizado para poder demostrar como influye el pH en la liberación de los principios activos a partir de las cadenas poliméricas de cada polímero, en este trabajo este estudio fue a partir de comprimidos, los cuales se obtuvieron como se redacta a continuación.

4.4.1 Generación de comprimidos

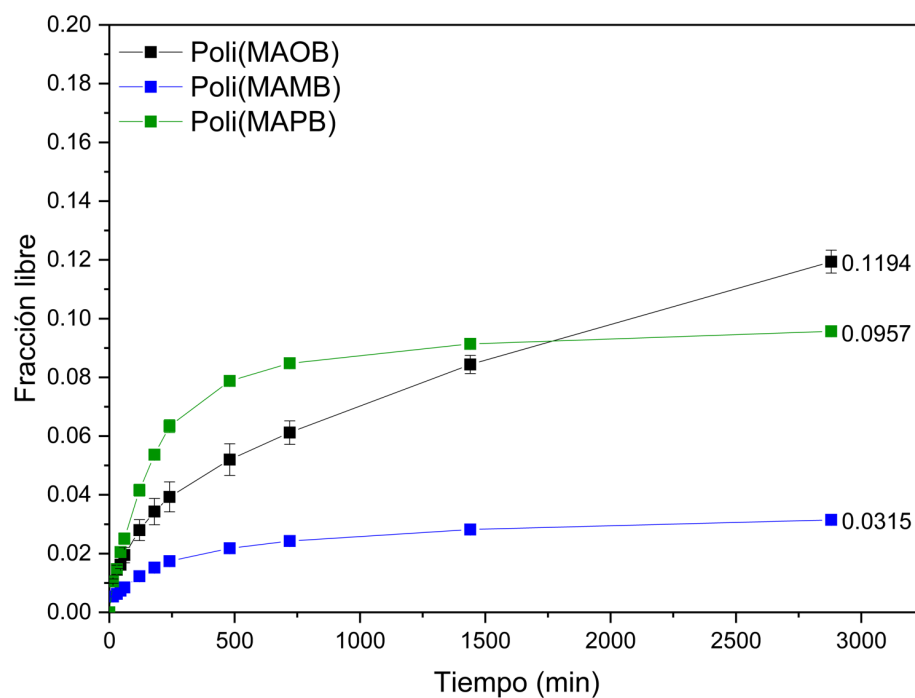
Se generaron comprimidos para los 3 polímeros por triplicado y para cada pH, dando como resultado la generación de más de 27 comprimidos con un peso promedio de 50.22 mg. De los tres polímeros el más complicado de comprimir fue el poli(MAMB) ya que fue el que más seco se presentó y en partículas más finas y constantemente los comprimidos eran muy frágiles, por lo que era necesario hacerlos en épocas frías y tomaba más tiempo que los demás en obtener los comprimidos finales.

4.4.2 Estudio hidrolisis-liberación

En la **Gráfica 2**, se representan las tres liberaciones empleando el método de análisis para ácido *o*-hidroxibenzoico, ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico libre de los comprimidos de poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) por CLAR a pH 1.2, se realizó por triplicado, incluyendo sus respectivas desviaciones estándar en el gráfico.

Al igual que se apreciará a pH 6.8 y 7.4, existe una diferencia marcada a simple vista en la cantidad liberada a través de las 48 horas de muestreo. El polímero que más liberó fue el poli(MAOB), liberando un 11% del fármaco disponible en el comprimido (67 %), mientras que el poli(MAPB) tuvo una liberación más rápida que el poli(MAOB) inicialmente, pero, a pesar de esto lo máximo liberado fue un poco más del 9% del fármaco disponible en el comprimido y al igual que como se verá en los otros pH, el poli(MAMB) fue el que menos cantidad de fármaco consiguió liberar, con menos del 4% del fármaco disponible en el comprimido como se muestra en la **Gráfica 2**.

Ya que la hidrólisis es una reacción de sustitución nucleofílica sobre carbono insaturado, el ácido que actúa como catalizador, primero protona el oxígeno del carbonilo y posteriormente se produce el ataque nucleofílico del agua para formar el intermediario tetraédrico como se puede observar en el mecanismo propuesto en la **Figura 46**, esta etapa determina la velocidad de reacción. El ácido aumenta la velocidad de formación del intermediario tetraédrico al protonar el oxígeno del carbonilo, porque un grupo carbonilo protonado es más susceptible de ser atacado por un nucleófilo que un grupo carbonilo no protonado, ya que los ésteres se hidrolizan lentamente porque poseen grupos salientes muy básicos y además el agua es un nucleófilo débil. (Caglieri & Macaño, 2010).



Gráfica 2. Liberación de comprimidos (n = 3) de poli(MAOB), poli(MAMB) y MAPB a pH 1.2 por CLAR.

Basándonos en lo anterior y debido a que no existe una buena estabilidad de cargas en este tipo de hidrólisis, esta tiende a ser deficiente, como se observa en las reducidas fracciones liberadas en el caso de los tres polímeros en la **Gráfica 2**.

Podemos teorizar que debido a la ubicación espacial del grupo carboxilo en el poli(MAMB) y poli(MAPB), puede que se reduzca la velocidad de formación del intermediario tetraédrico, por lo cual, estos liberen menos principio activo.

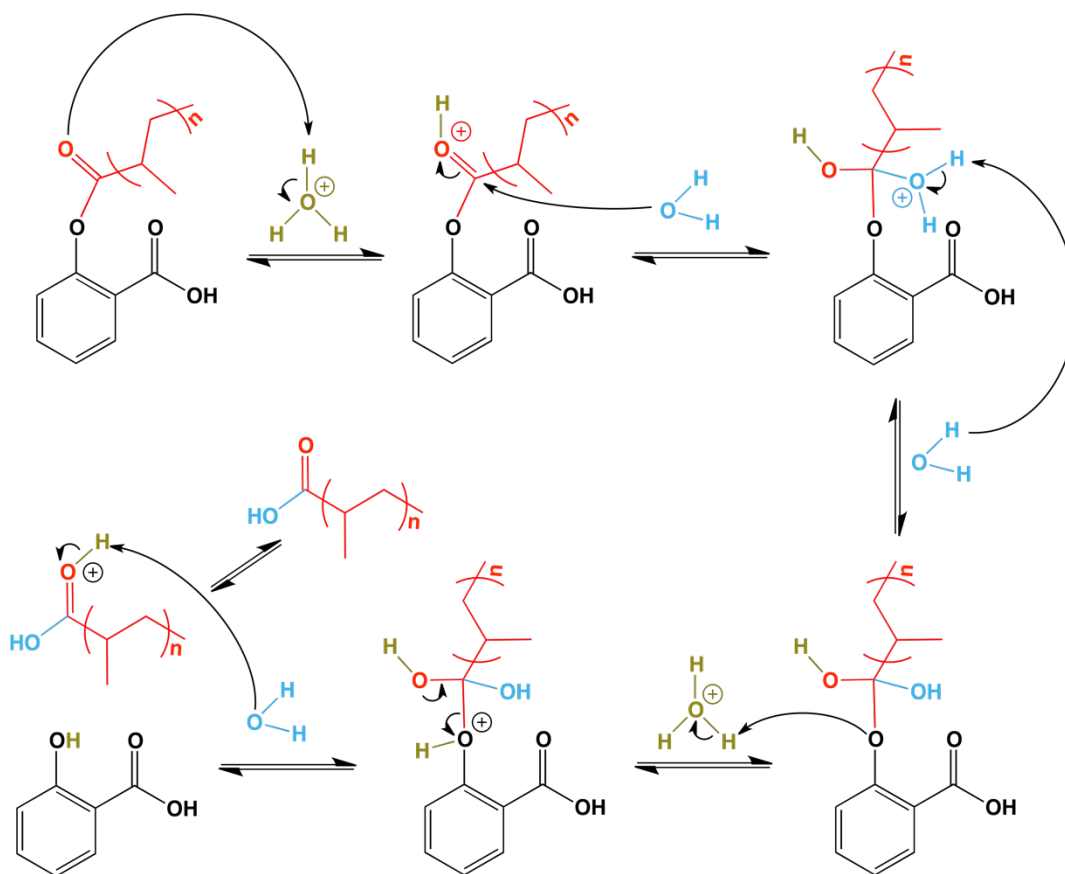
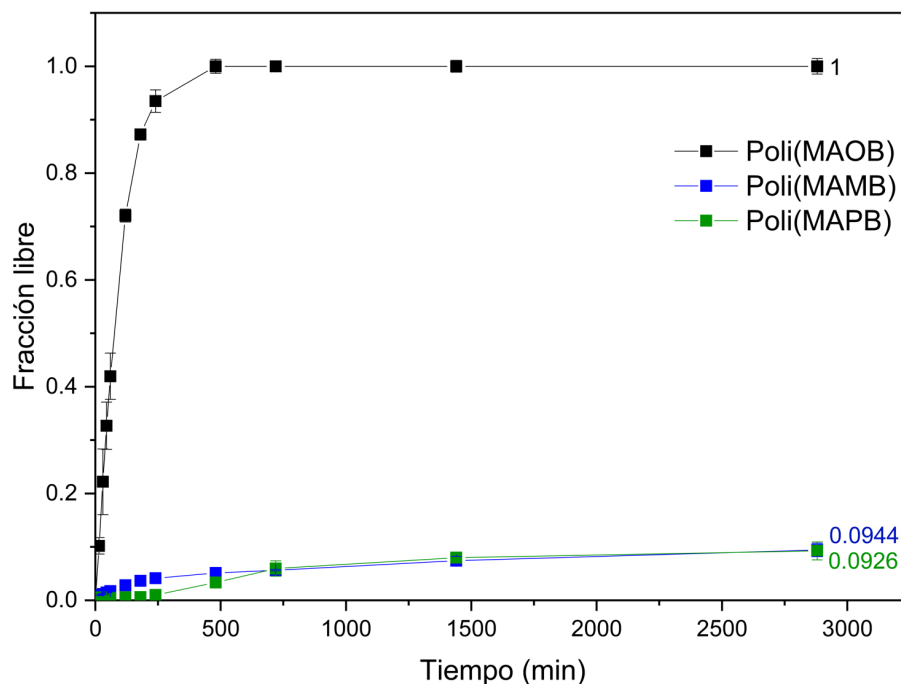


Figura 46. Mecanismo de hidrólisis sugerido para el poli(MAOb) en pH 1.2, que consiste en una catálisis ácida, se teoriza que el mecanismo de hidrólisis es igual para el poli(MAMB) y poli(MAPB), basándonos en las bajas, pero cercanas fracciones liberadas en este pH.

En la **Gráfica 3**, se representan de igual forma las tres liberaciones ($n = 3$) empleando el método de análisis para los principios activos libres de los comprimidos de poli(MAOb), poli(MAMB) y poli(MAPB) por CLAR a pH 6.8.

Se puede apreciar, que hubo una variación significativa en cuanto a la velocidad de liberación y al porcentaje liberado principios activos liberados. En cuanto al poli(MAOb), liberó el 100% del AS disponible en el polímero desde las primeras 8 horas de muestreo, lo que nos lleva a confirmar que existe una dependencia muy marcada del polímero con respecto al pH del medio. Mientras que en

el caso del poli(MAPB) se aprecia que liberó un poco más del 9% a las 48 horas de muestreo, muy similar a lo liberado a pH 1.2, esto fue corroborado con un triplicado extra ($n = 6$), siendo una hidrólisis muy deficiente tomando en consideración el porcentaje liberado del poli(MAOB). Finalmente, para este mismo pH, el poli(MAMB), liberó un poco más del 9% a las 48 h.



Gráfica 3. Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAOB), poli(MAMB) y MAPB a pH 6.8 por CLAR.

Pueden haber varios factores a los que se deban estos porcentajes tan bajos en estos dos último polímeros, uno de ellos puede ser la ubicación espacial del grupo carboxilo en el poli(MAMB) y poli(MAPB), ya que como se sabe, en el caso del ácido acetilsalicílico (AAS o aspirina), la velocidad de la hidrólisis se puede aumentar a través de una catálisis básica general intramolecular (Fersht & Kirby, 2002) la cual se puede observar en la **Figura 47**. Esto se logra por la cercanía del grupo carboxilo con el grupo éster en el caso de la posición *o*, y en el caso de las posiciones *m* y

p, al no estar cerca no se lograría aumentar la velocidad de formación del intermediario tetraédrico. Esto nos permite aceptar el mecanismo propuesto por Bender, que explica el comportamiento del poli(MAOB) a pH 6.8 y 7.4.

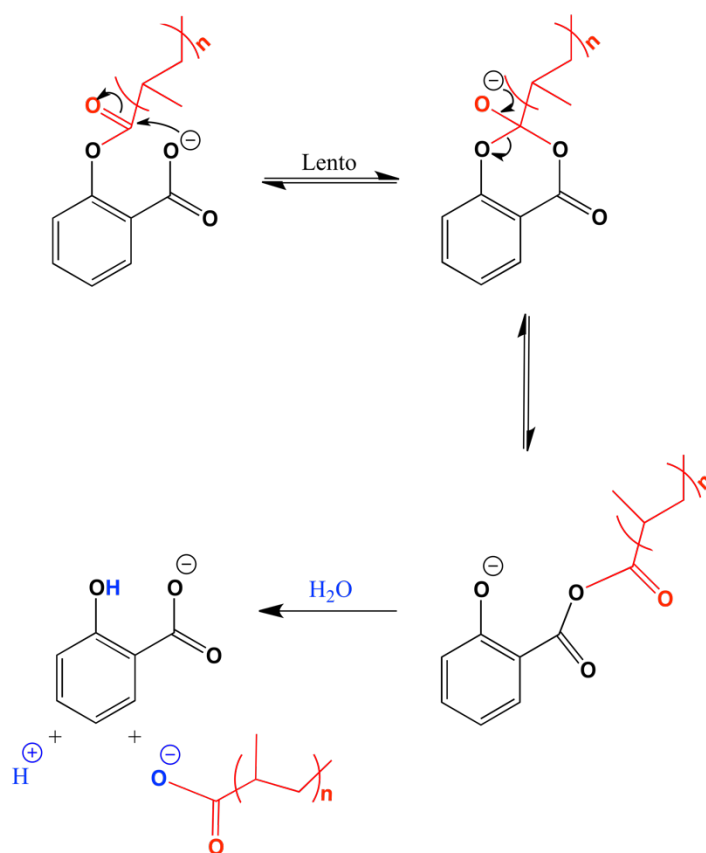


Figura 47. Mecanismo de hidrólisis sugerido para el poli(MAOB) en pH 6.8 y 7.4, que consiste en una catálisis nucleofílica intramolecular por el grupo carboxilo ionizado, mecanismo propuesto por Bender (Bender, 2002) para la hidrólisis de la aspirina en la zona independiente (entre pH 4 y 8) (Edwards, 1950).

Mientras que para las posiciones *m* y *p*, el mecanismo que se propone que sucede, se muestra en la **Figura 46**, que como ya se mencionó anteriormente, debido a la posición espacial del grupo carboxilo, no es posible una catálisis nucleofílica intramolecular. En este mecanismo el carboxilato

también da inicio al mecanismo de la hidrólisis, pero atacando a una molécula de agua, que a su vez atacará nucleofílicamente al carbonilo del éster, dando como resultado la formación del intermediario tetraédrico y, por consiguiente, la hidrólisis de los principios activos.

A pH básicos (**Figura 48**), la ausencia de catálisis de las reacciones intermoleculares con oxianiones está de acuerdo con la catálisis básica general, ya que el ataque de un nucleófilo que no tiene protones ácidos no puede ser asistido por una base (Fersht & Kirby, 2002).

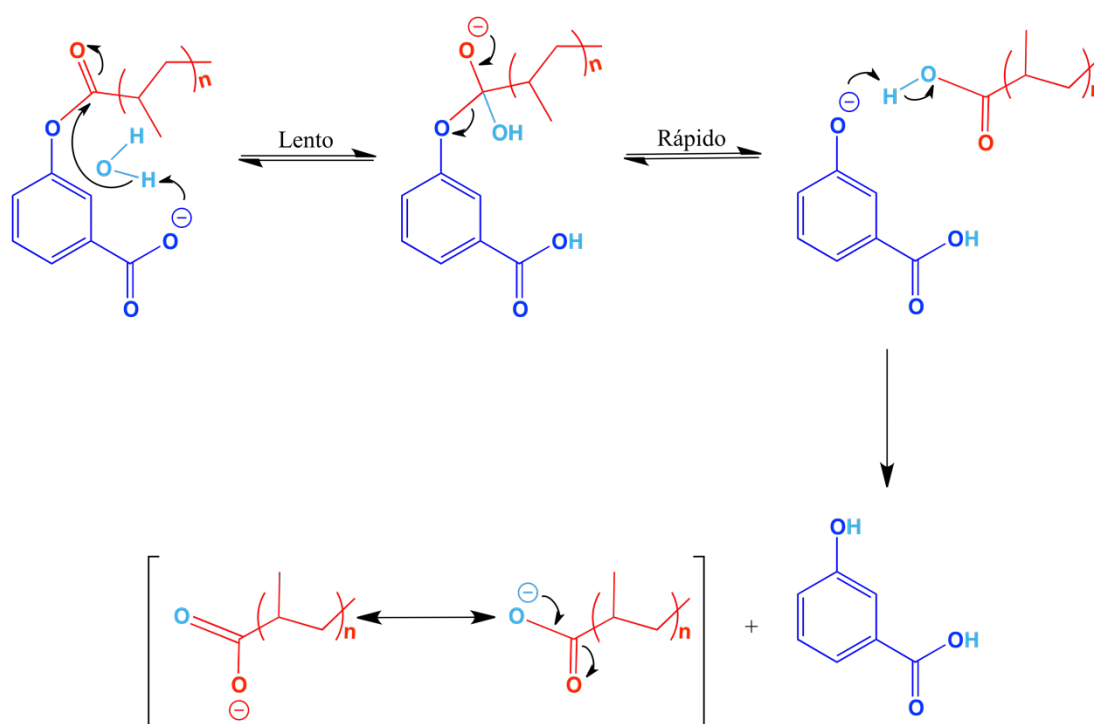
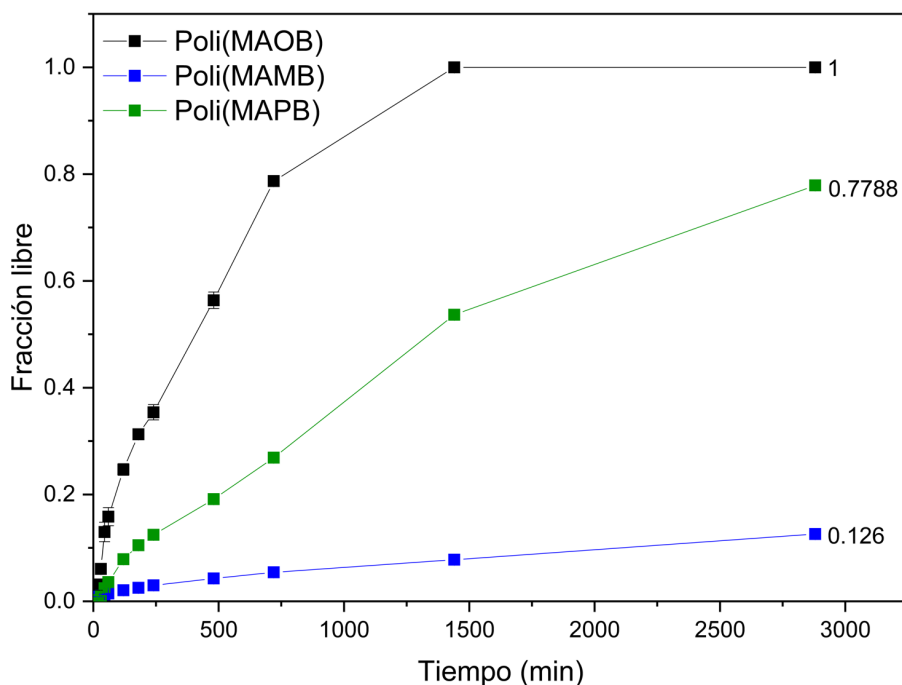


Figura 48. Mecanismo de hidrólisis sugerido para el poli(MAMB) y poli(MAPB) en pH 6.8 y 7.4, que consiste en una catálisis básica general clásica del ataque del agua por el anión carboxilato (Fersht & Kirby, 2002).

Finalmente, en la **Gráfica 4**, se representan de igual forma las tres liberaciones ($n=3$) empleando el método de análisis para los principios activos libres de los comprimidos de poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) por CLAR a pH 7.4.

En cuanto al poli(MAOB), se puede apreciar en la que liberó el 100% de AS en las primeras 24 horas de muestreo (16 h después, en comparación con el pH 6.8), aún así existe una dependencia muy marcada del polímero con respecto al pH del medio en comparación con los demás polímeros. Mientras que en el caso del poli(MAPB), liberó un poco más del 54% a las 24 h y casi un 80% a las 48 h dándole una respuesta intermedia al pH del medio, tomando en consideración los porcentajes liberados del poli(MAOB). Finalmente, para este pH, el poli(MAMB), liberó menos del 8% a las 24 horas de muestreo y un poco más del 12% a las 48 h.



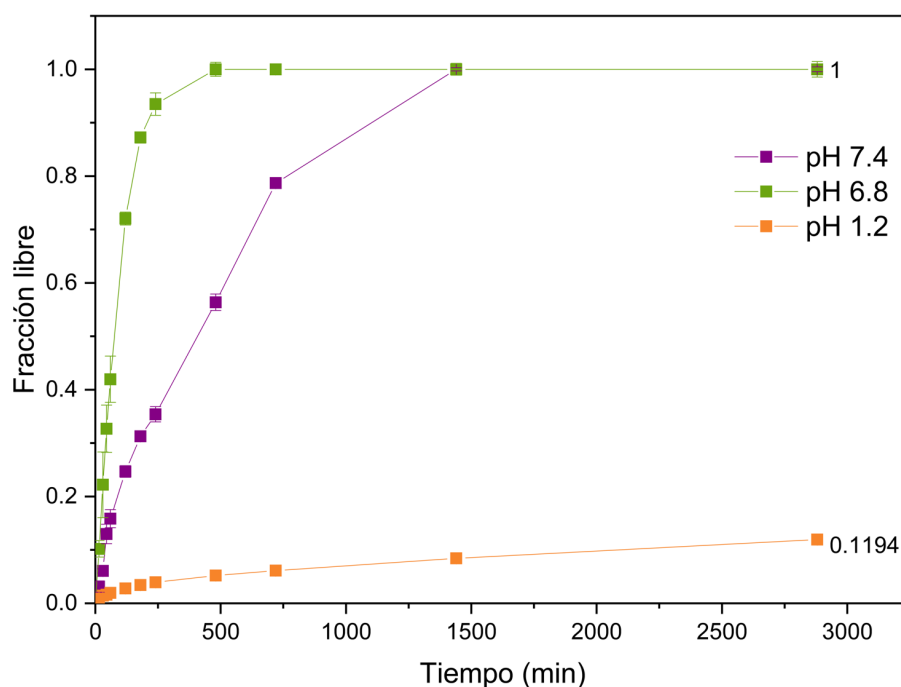
Gráfica 4. Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAOB), poli(MAMB) y MAPB a pH 7.4 por CLAR.

Pueden haber varios factores a los que se deban estos porcentajes tan bajos en este último polímero inclusive a pH 7.4, uno de ellos puede ser la muy baja solubilidad del principio activo liberado, ya

que el AMH es el menos soluble de los tres productos de degradación y por ende el que menos se libere de los tres, debido a que se propone que los comprimidos sufren de erosión heterogénea o superficial (depende del área de superficie del dispositivo y no de su volumen) y una baja solubilidad del producto de degradación reduciría la fuerza impulsora que acelera la degradación de los comprimidos (Whitaker-Brothers & Uhrich, 2006).

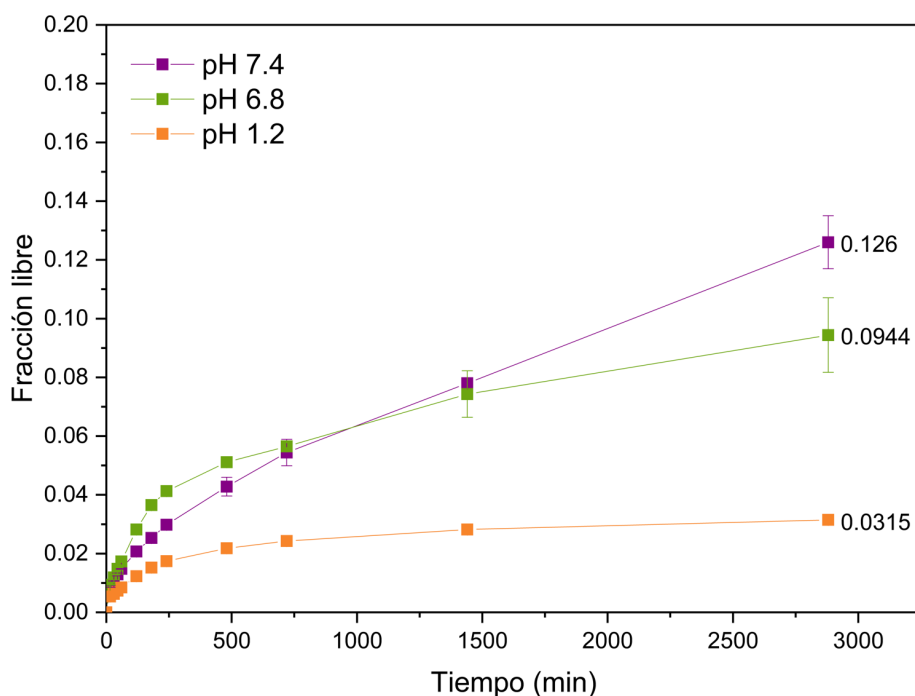
Estas pruebas de liberación fueron realizadas con membranas de diálisis; esto con el fin de que en el momento en que se liberaran los grupos colgantes de la cadena polimérica, el esqueleto restante, de gran tamaño, quedara retenido dentro de la membrana y en el medio externo con respecto a la membrana, solo se encontraran presentes los principios activos liberados resultante de la hidrólisis y para tratar de simular como sería el tránsito de estas moléculas a través de tejidos.

Ahora bien, para tener más apoyo visual y para poder discutir mejor los datos arrojados por la liberación a los diferentes pH, se muestran a continuación los gráficos individuales para cada polímero en los tres pH fisiológicos en los que se probaron. Iniciando por el poli(MAOB), que se puede observar en la **Gráfica 5**, es muy marcada la gran diferencia que existe entre los pH 6.8 y 7.4 con respecto al pH 1.2, esto como ya se mencionó anteriormente es debido al mecanismo propuesto por Bender (**Figura 45**), que requiere de un grupo carboxilo ionizado para poder llevar a cabo la hidrólisis a mayor velocidad, esto no sucede a pH 1.2, ya que se encuentra en su forma no ionizada en su totalidad y por ende, se teoriza que lo que se logra hidrolizar es debido a una deficiente catálisis ácida clásica, que es mucho más lenta debido a que no existe una buena estabilidad de cargas.



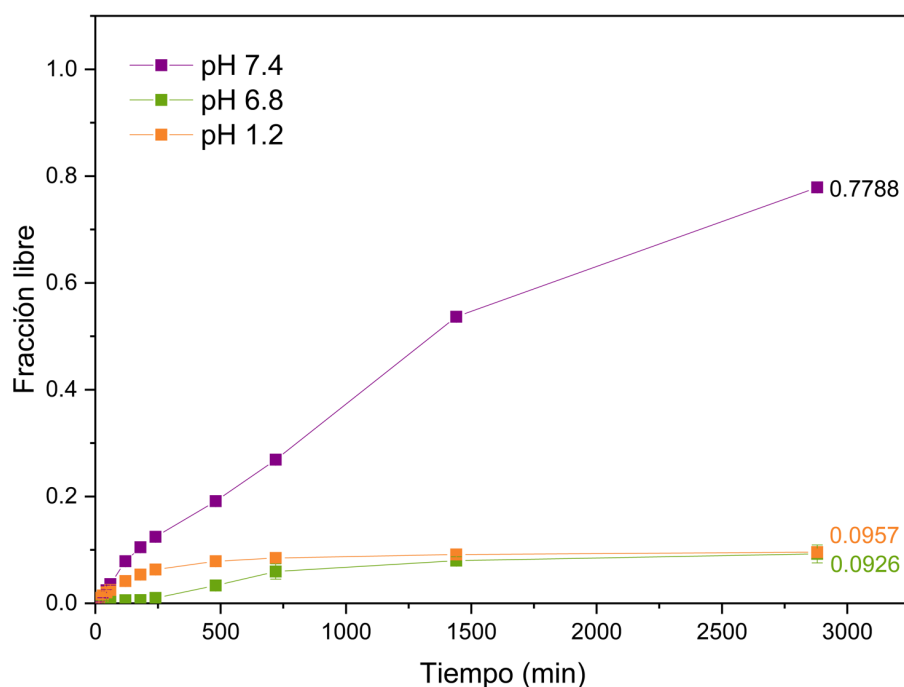
Gráfica 5. Liberaciones de comprimidos (n = 3) de poli(MAOB) a pH 1.2, 6.8 y 7.4 por CLAR.

Continuando con el poli(MAMB) (**Gráfica 6**), a ninguno de los pH existió una liberación del principio activo destacada, la mayor cantidad liberada que fue de aproximadamente el 12% a pH 7.4, es apenas un poco superior a la más baja obtenida por el poli(MAOB), que fue de también aproximadamente 12% a pH 1.2. Se sospecha que la solubilidad del AMH es de las principales causas de este comportamiento, ya que de los tres principios activos es el menos soluble. En cuanto al pKa, el del AMH (3.84) se encuentra entre el del AOH (2.97) y el APH (4.54), por lo que, si dependiera del grado de ionización, debería tener una respuesta intermedia a las obtenidas por las otras posiciones.



Gráfica 6. Liberaciones de comprimidos ($n = 3$) de poli(MAMB) a pH 1.2, 6.8 y 7.4 por CLAR.

Finalmente, el poli(MAPB), que se puede observar en la **Gráfica 7**, mostró una mucho mejor respuesta a pH 7.4 con respecto al pH 1.2 y 6.8, algo muy curioso que sucede tanto con la posición *m* como con la posición *p*, es que liberan casi la misma cantidad de principio activo a las 48 h a pesar de tener diferente sustitución, pero a pH 7.4 en el caso del *p*, la hidrólisis aumenta hasta liberar casi un 80%, se puede teorizar que por la lejanía del carboxilato a el enlace éster, este no interfiere en lo más mínimo en la formación del intermediario tetraédrico, sin embargo, si participa activamente en el ataque a moléculas de agua, permitiendo una mayor velocidad en cuanto a la hidrólisis.



Gráfica 7. Liberaciones de comprimidos (n = 3) de poli(MAPB) a pH 1.2, 6.8 y 7.4 por CLAR.

La cinética de la hidrólisis del ácido *o*-hidroxibenzoico, ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico y la velocidad de hidrólisis de los comprimidos, se evaluó a 37 °C y pH 1.2, 6.8 y 7.4 como ya se mostró anteriormente. Estas condiciones como se observó modifican la velocidad de hidrólisis y la cinética de la liberación. En la **Tabla 13**, se muestran los modelos cinéticos y los valores de las constantes de velocidad. Se observaron cinéticas de primer orden a pH 7.4 para el caso de los tres polímeros. Los datos arrojados por el poli(MAOB) a pH 1.2 y 6.8, se ajustaron apropiadamente al modelo de Weibull, mientras que en el caso del poli(MAMB) y poli(MAPB), se mantuvo una cinética de primer orden.

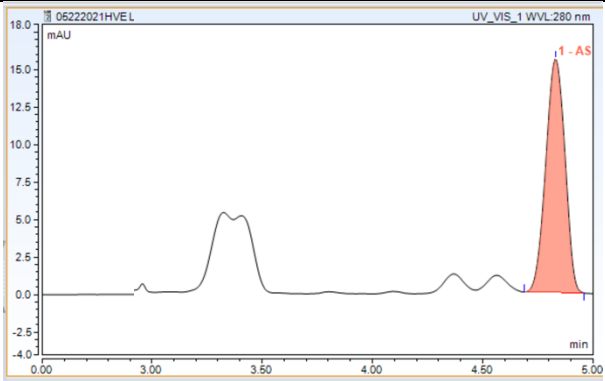
Tabla 13. Modelos cinéticos y valores de las constantes de velocidad de los polímeros a diferentes pH.

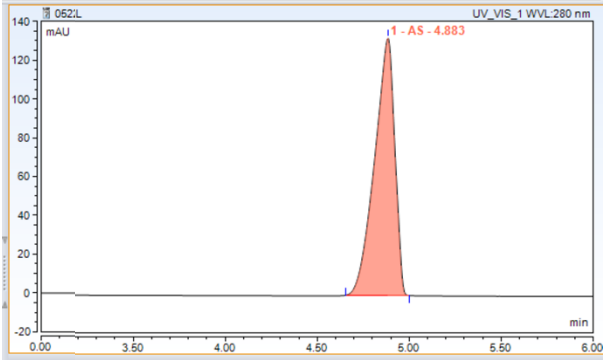
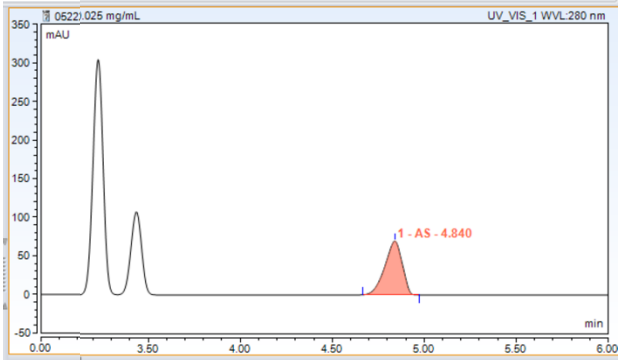
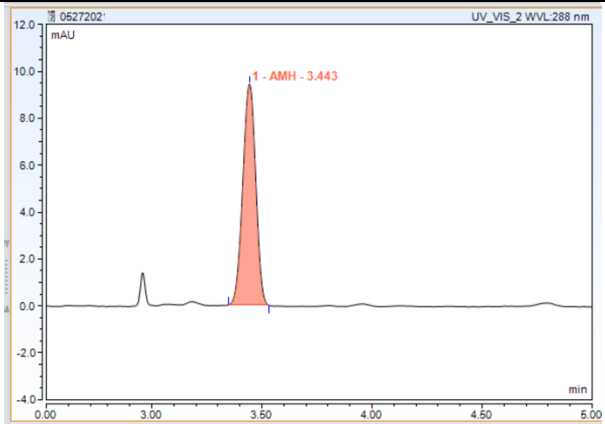
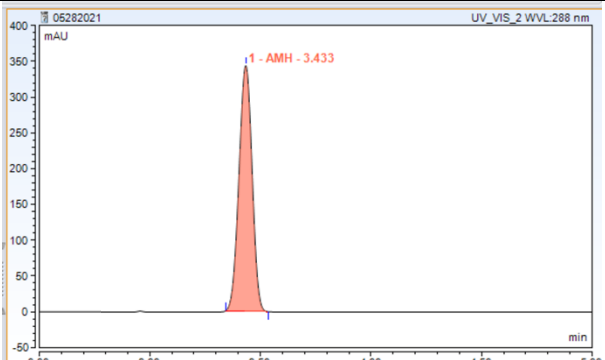
Polímero	pH de medio de liberación	Temperatura (°C)	Modelo	Constante de liberación	R ²
Poli(MAOB)	1.2	37 °C	Weibull	N/A	0.9941
Poli(MAOB)	6.8	37 °C	Weibull	N/A	0.99411
Poli(MAOB)	7.4	37 °C	1er orden	0.0014 h ⁻¹	0.9654
Poli(MAMB)	1.2	37 °C	1er orden	0.0015 h ⁻¹	0.965
Poli(MAMB)	6.8	37 °C	1er orden	0.001 h ⁻¹	0.9575
Poli(MAMB)	7.4	37 °C	1er orden	0.0172 h ⁻¹	0.9984
Poli(MAPB)	1.2	37 °C	1er orden	0.0022 h ⁻¹	0.9387
Poli(MAPB)	6.8	37 °C	1er orden	0.0014 h ⁻¹	0.9733
Poli(MAPB)	7.4	37 °C	1er orden	0.0011 h ⁻¹	0.9715

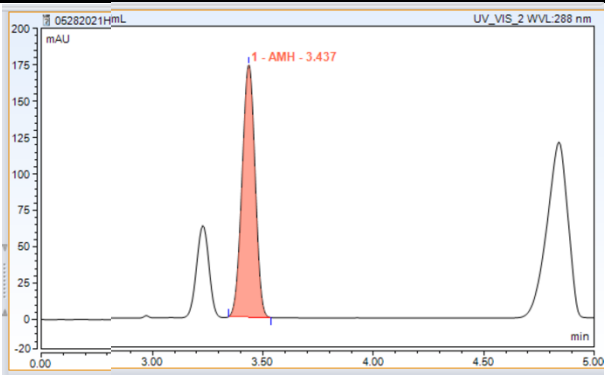
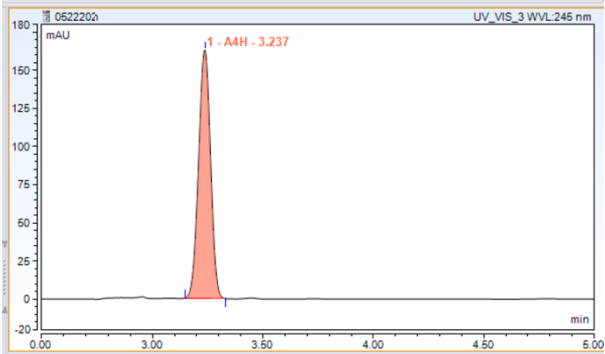
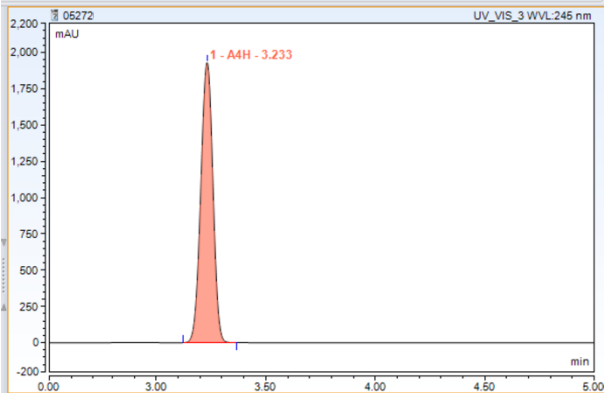
4.4.3 Método de análisis para cuantificación de ácido *o*-hidroxibenzoico, ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico libre de los comprimidos por CLAR

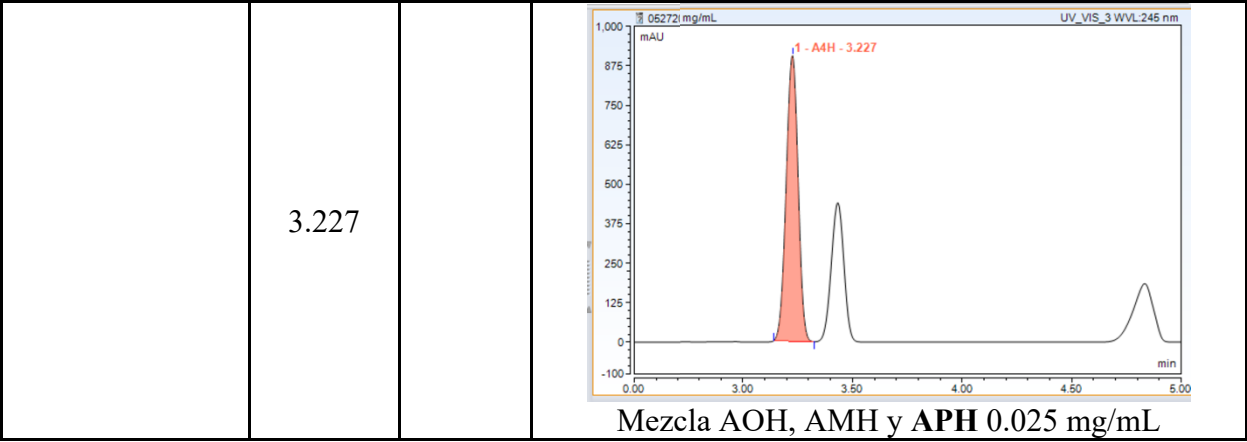
El método cromatográfico empleado, que inicialmente fue extraído de la FEUM, fue modificado en varias condiciones del método, algunos de ellos por necesidad como se verá a continuación, este método fue creado inicialmente para el AOH, a pesar de esto, los picos que tuvieron mejor asimetría, mayor número de platos teóricos y menores tiempos de retención fueron el AMH y APH. A continuación, se muestran los cromatogramas de gran parte de lo que se realizó durante este proyecto mediante CLAR, como prueba de resultados y de que el método realmente nos fue útil en la cuantificación de los principios activos.

Tabla 14. Cromatogramas del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y el APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) a pH 1.2 con el método de cuantificación por CLAR.

pH 1.2			
Principio activo	t _R (min)	λ (nm)	Cromatograma
Ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico	4.83	280 nm	 Liberación de poli(MAOB) a las 48 h

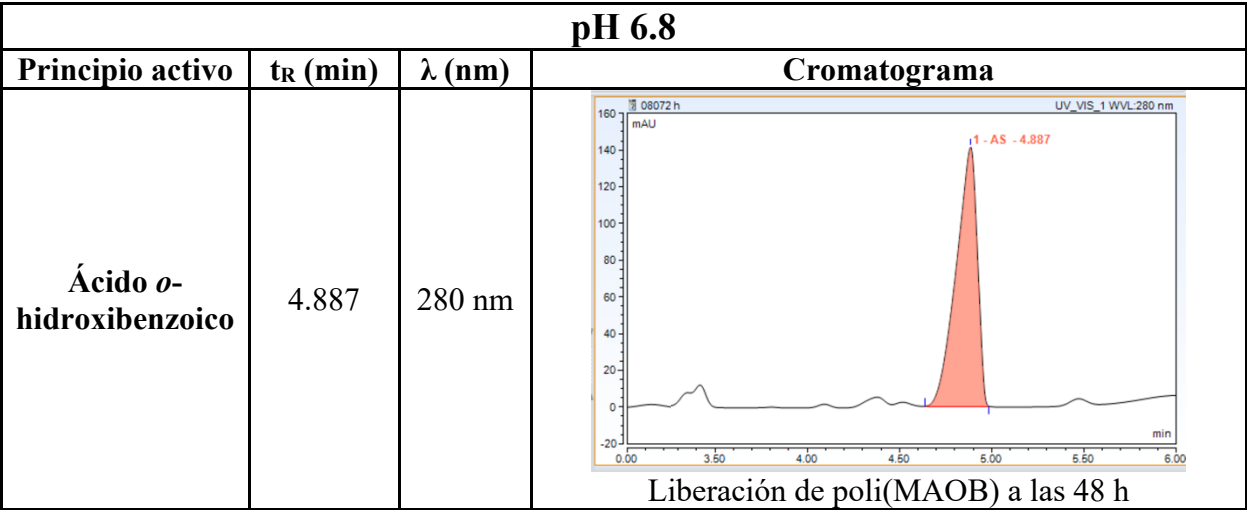
	4.883		 Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL
	4.84		 Mezcla AOH, AMH y APH 0.025 mg/mL
Ácido <i>m</i>-hidroxibenzoico	3.443	288 nm	 Liberación de poli(MAMB) a las 48 h
	3.433		

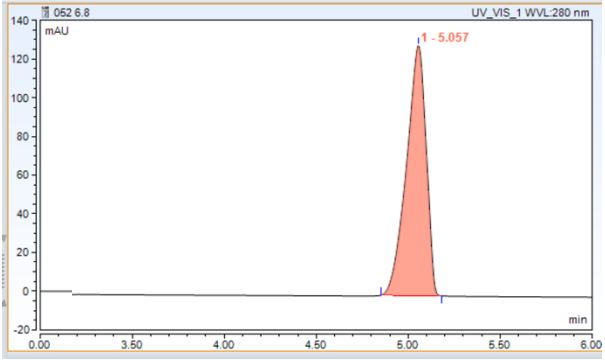
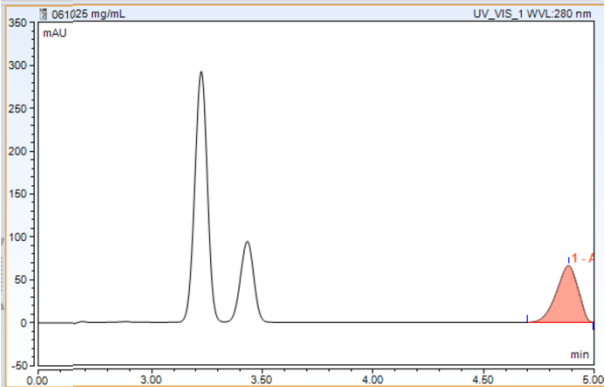
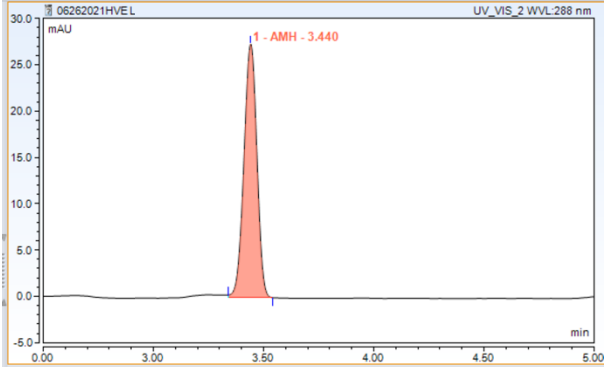
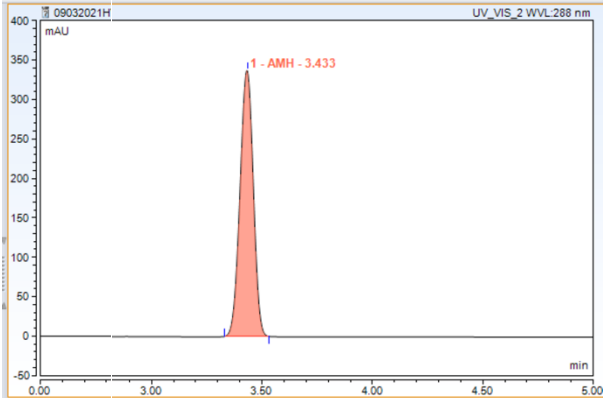
			Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL
	3.437		 Mezcla AOH, AMH y APH 0.025 mg/mL
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	3.237	245 nm	 Liberación de poli(MAPB) a las 48 h
	3.233		 Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL

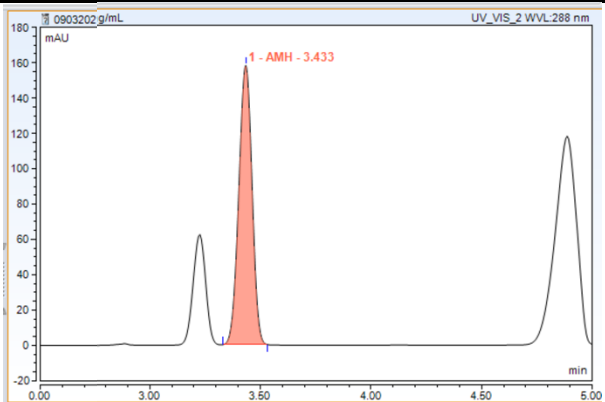
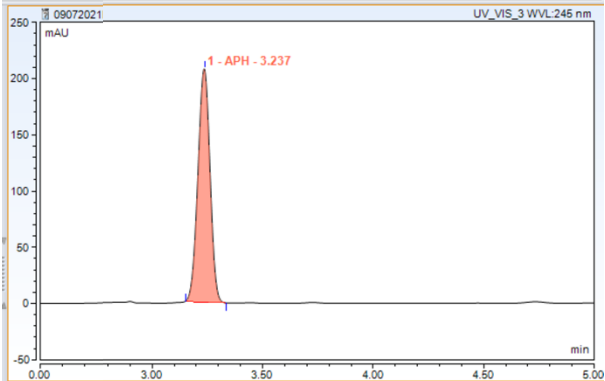
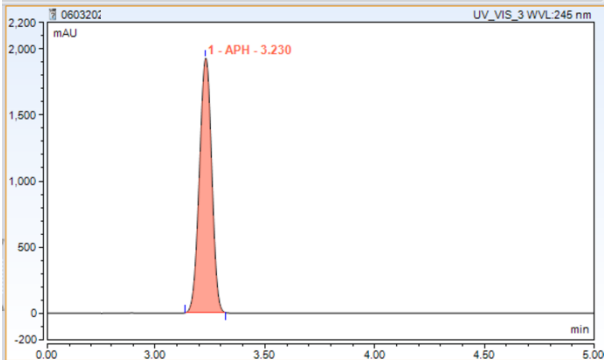


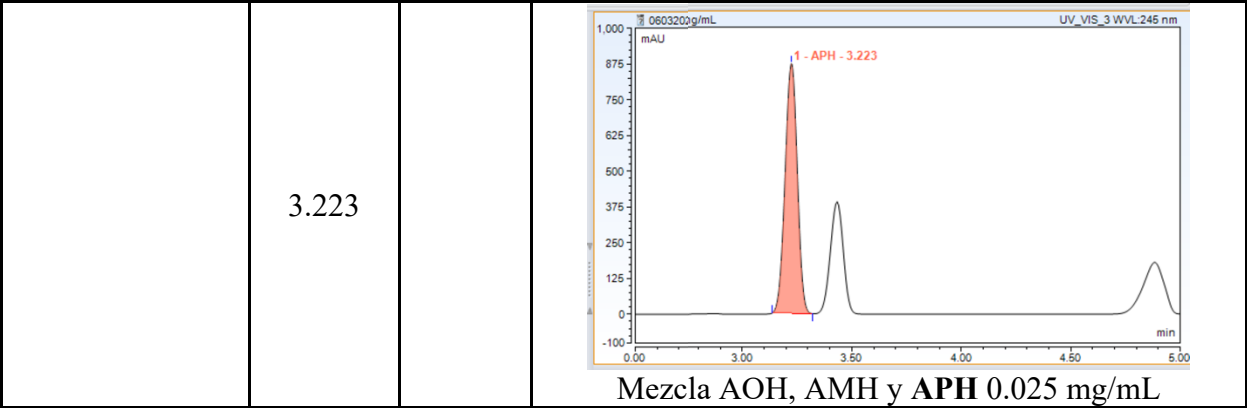
Como se pudo apreciar en la tabla anterior, con un tiempo de retención aproximado de 4.8 min, el AOH fue el principio activo con mayor t_R , y con un t_R de aproximadamente 3.2 min, el APH fue el principio activo con menor t_R , seguido muy de cerca por el AMH, que tuvo un t_R de aproximadamente 3.4 min, esto a pH 1.2, como se observará a continuación, estos valores son, en algunos casos, fácilmente influenciados por el pH de las muestras, la cercanía del grupo hidroxilo y el ácido carboxílico y el grado de ionización de cada principio activo.

Tabla 15. Cromatogramas del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y el APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) a pH 6.8 con el método de cuantificación por CLAR.



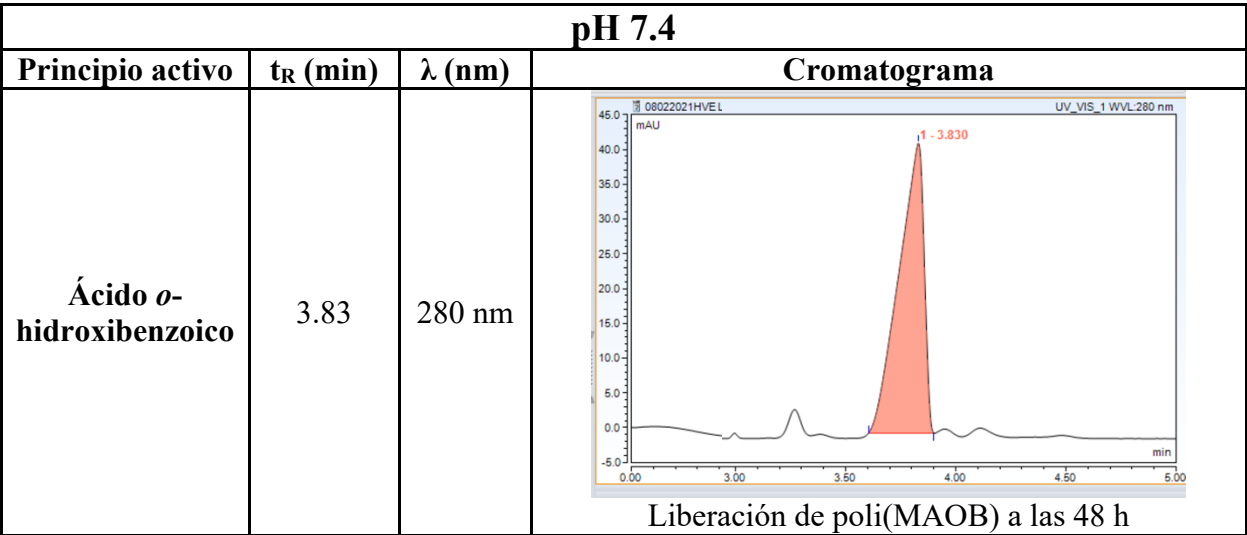
	5.057		 Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL
	4.88		 Mezcla AOH, AMH y APH 0.025 mg/mL
Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico	3.440	288 nm	 Liberación de poli(MAMB) a las 48 h
	3.433		

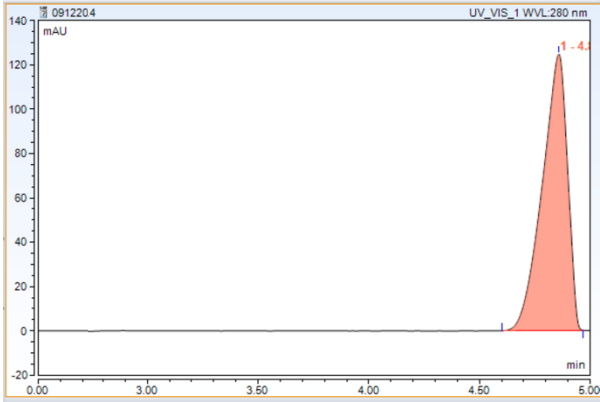
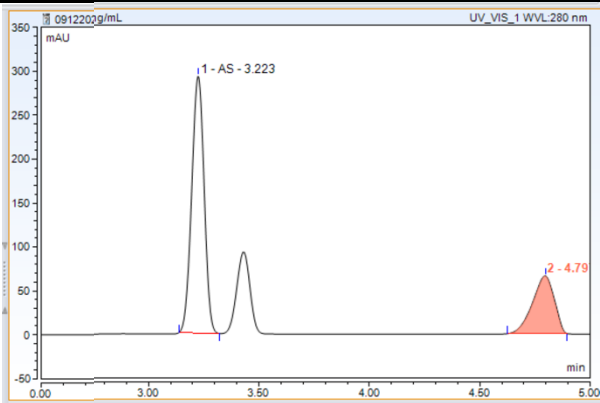
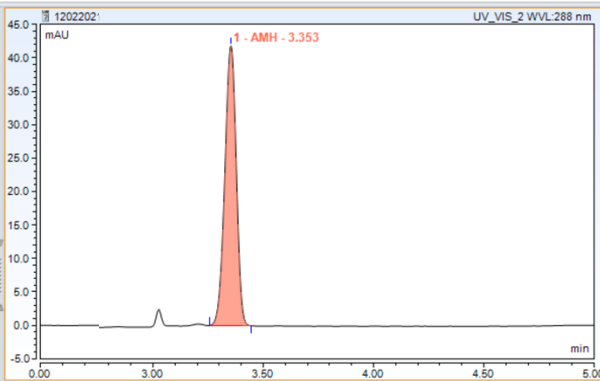
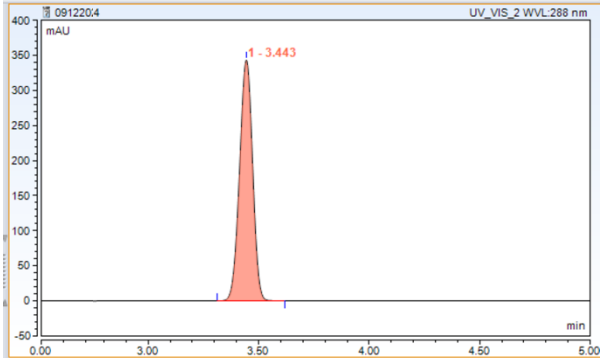
			Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL
	3.433		 Mezcla AOH, AMH y APH 0.025 mg/mL
Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico	3.237	245 nm	 Liberación de poli(MAPB) a las 48 h
	3.230		 Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL

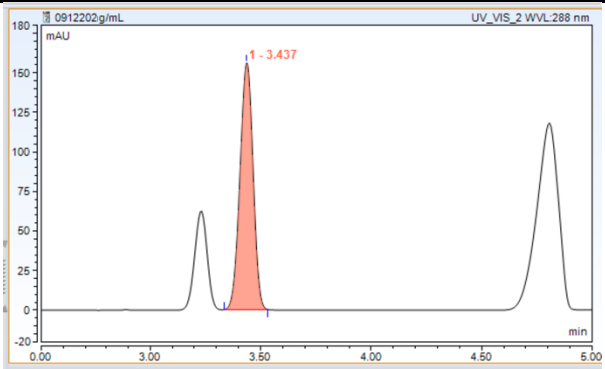
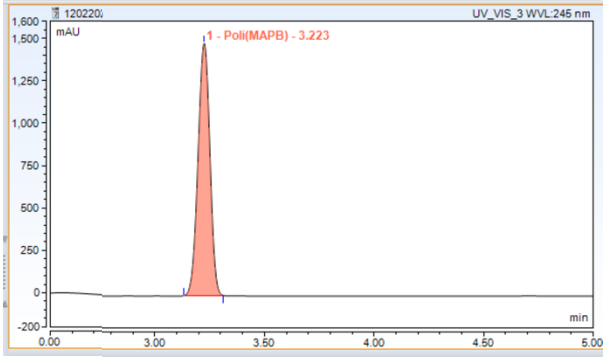
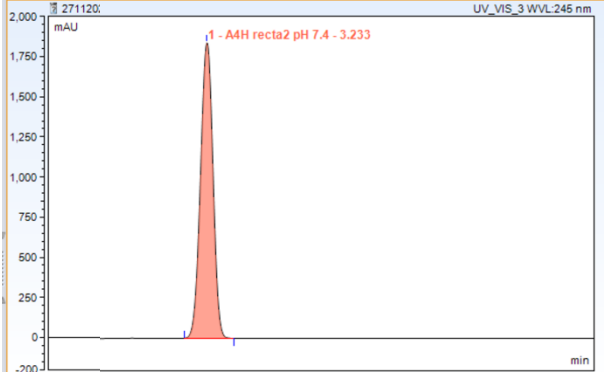


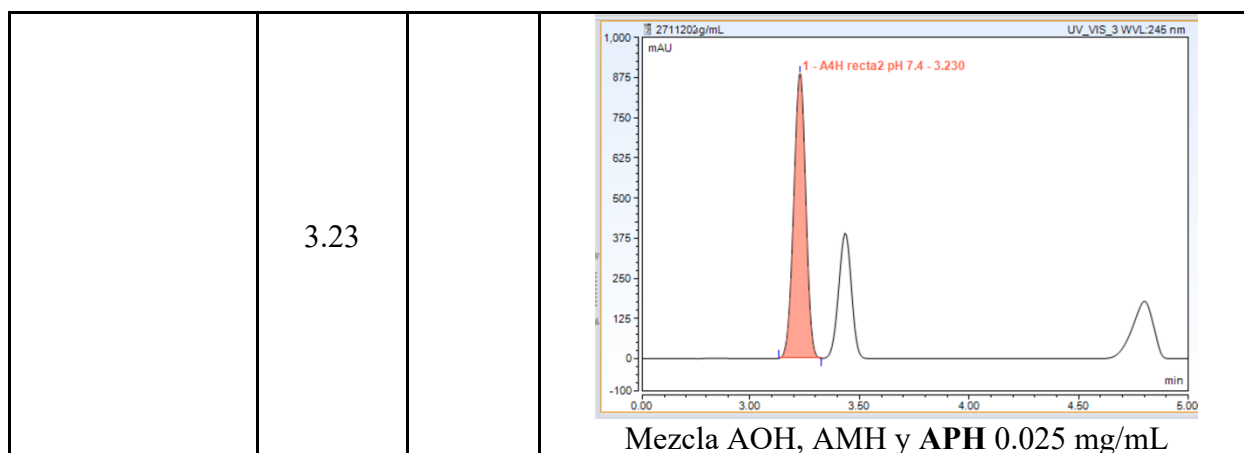
Se observa rápidamente que tanto el APH y el AMH, conservan muy similares tiempos de retención a pH 6.8 con respecto al pH 1.2, con t_R de aproximadamente 3.2 min y 3.4 min, respectivamente, mientras que en AOH, se comienzan a detectar desplazamientos destacables en respuesta al aumento de pH, como es el caso de la recta de calibración en la que se alcanza un t_R de más de 5 min.

Tabla 16. Cromatogramas del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y el APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) a pH 7.4 con el método de cuantificación por CLAR.



	4.857		 Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL
	4.79		 Mezcla AOH, AMH y APH 0.025 mg/mL
Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico	3.353	288 nm	 Liberación de poli(MAMB) a las 48 h
	3.443		

			Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL
	3.437		 Mezcla AOH, AMH y APH 0.025 mg/mL
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	3.223	245 nm	 Liberación de poli(MAPB) a las 48 h
	3.233		 Concentración más alta de recta de calibración 0.2 mg/mL



Finalmente, el APH y el AMH, conservan muy similares tiempos de retención a pH 7.4 de igual manera, con t_R de aproximadamente 3.2 min y 3.4 min, respectivamente, mientras que en el caso del AOH, en la mezcla y la recta de calibración, se observa un t_R de 4.8 min aproximadamente, como se había venido presentando, mientras que en el caso de la liberación se tiene un t_R de casi 1 min menos de diferencia, este fue un problema recurrente al que nos enfrentamos, que en algunos casos predominaba la especie protonada y en otros la no protonada, o una mezcla de ambas como se logra apreciar en la liberación del poli(MAOB) a pH 1.2. Por la literatura se sabe que cuando se trabaja con moléculas ácidas, si la fase móvil se encuentra dos o más unidades por debajo del pK_a de la molécula, como es el caso para los tres principios activos ($pK_{aAOH} = 2.97$, $pK_{aAMH} = 3.84$ y $pK_{aAPH} = 4.54$) a pH 1.2, estos tiempos de retención son mayores al caso contrario. Dos unidades o más unidades por arriba del pK_a de la molécula como es a pH 6.8 y 7.4, los t_R se reducen drásticamente, por el grado de ionización y por ende la afinidad a la columna, esto solo se observó para el caso del AOH y exclusivamente en las muestras de liberación, que fue cuando los t_R se redujeron aproximadamente 1min a 7.4 en comparación con el pH 1.2.

Todos estos detalles pueden ser mejorados con una correcta acidificación de las muestras para que predomine la especie protonada y una muy buena agitación en vórtex.

Como se mencionó al inicio, estos cromatogramas se incluyen como prueba de resultados y de que el método realmente nos fue útil en la cuantificación de los principios activos. También nos arrojó datos valiosos en cuanto a la polaridad de los principios activos; ya que al ser cromatografía en fase reversa, la fase estacionaria, en este caso la columna, al ser una C18, es no polar y la fase móvil al contrario era polar, por lo que tiempos de retención cortos nos decía que la molécula predominaba su forma no ionizada o su polaridad incluso en forma protonada era alta, como el caso del APH y AMH que mantuvieron bajos y similares tiempos de retención a través de los 3 diferentes pH, tentativamente por ser en todos estos casos la especie no protonada la que predominaba, ya que en estos dos casos el grupo hidroxilo y el ácido carboxílico se encuentran más alejados. Por el contrario, en el caso del AOH, los tiempos de retención elevados nos dicen de una elevada afinidad a la columna y esto puede deberse principalmente a la predominancia de la especie protonada, por la presencia de una gran cantidad de puentes de H intramoleculares, ya que es en este principio activo en el que más cercanos se encuentran el grupo hidroxilo y el ácido carboxílico espacialmente.

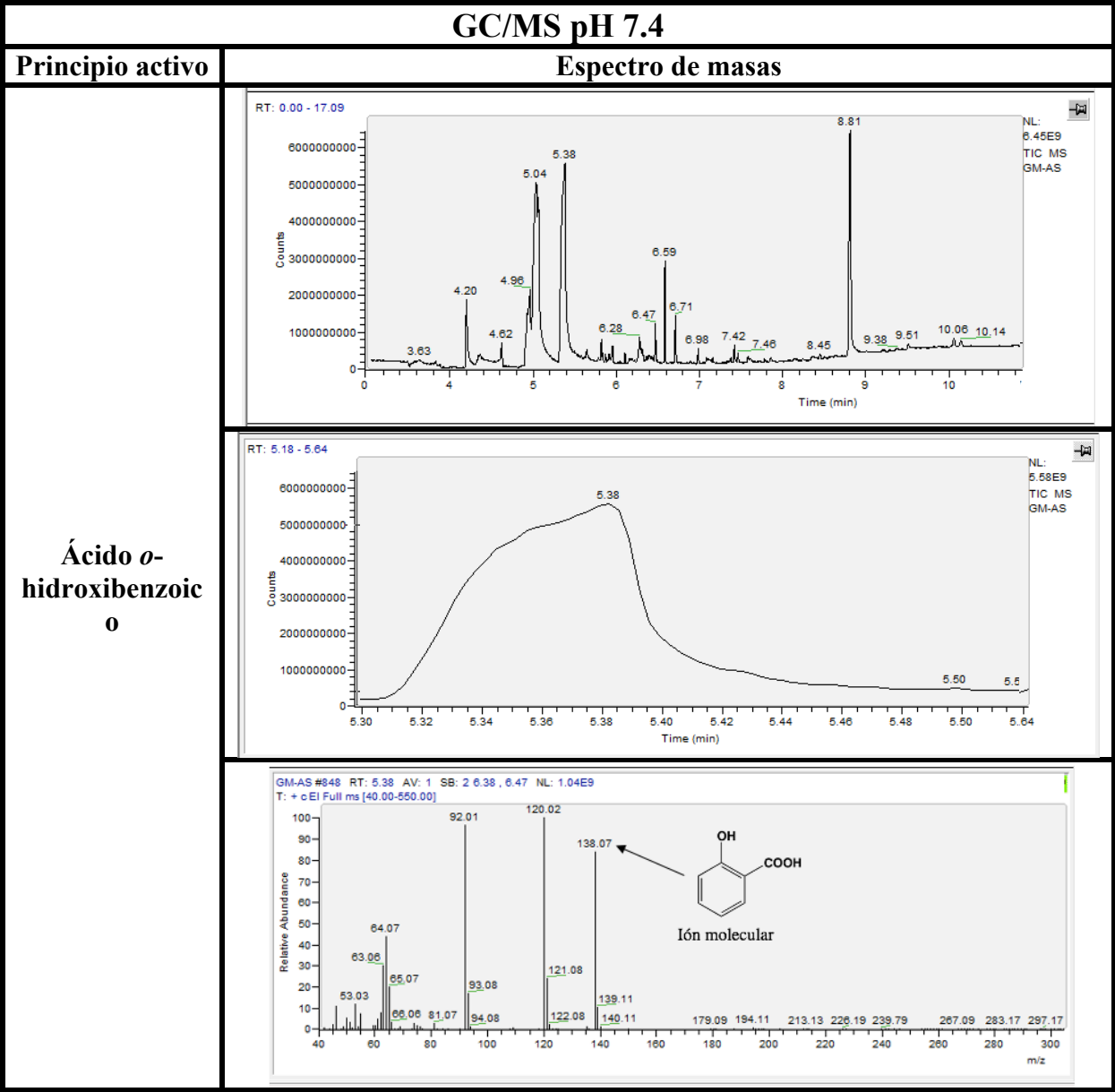
4.4.4 Detección del ión molecular por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

En la **Tabla 17**, se muestran los espectros de masas y cromatogramas realizados a muestras de medio tomadas de las liberaciones a pH 7.4 de los tres polímeros, tomándose las muestras de 48 h, las cuales presentarían la mayor liberación del principio activo.

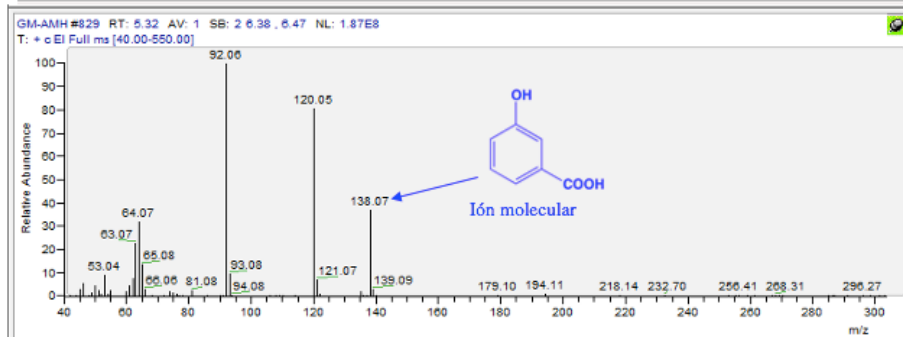
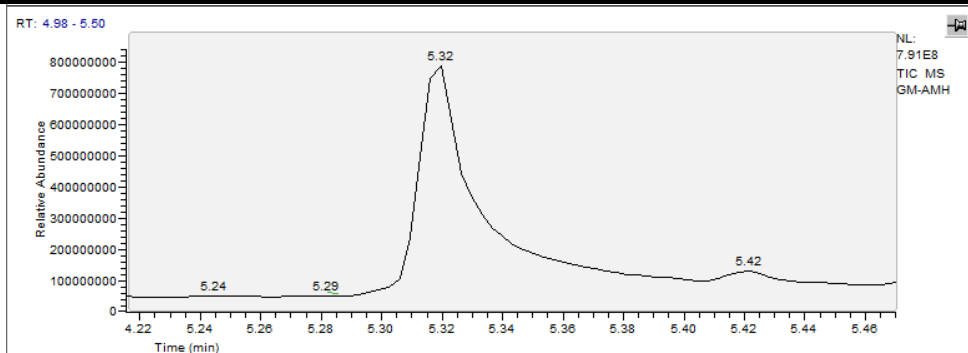
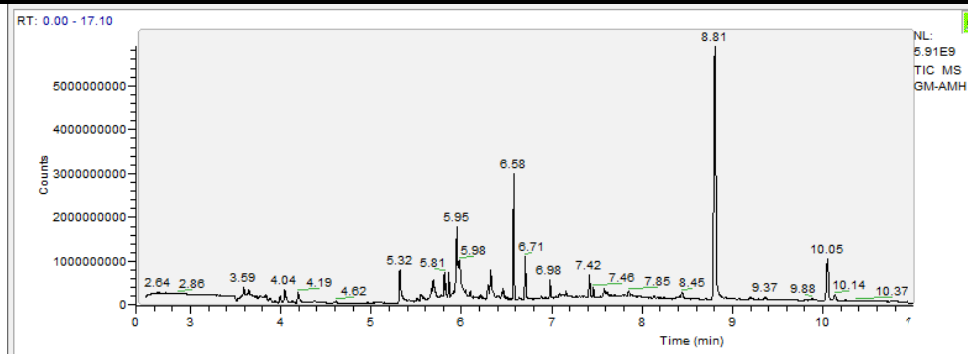
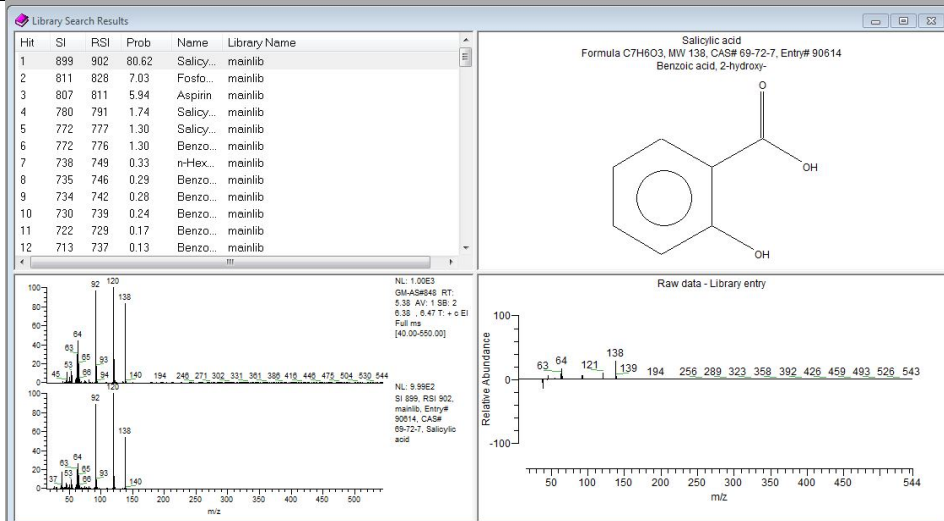
La importancia de esta prueba fue corroborar la presencia de los principios activos en los medios de liberación; ya que tanto el AOH, como el APH y el AMH presenta una masa molecular idéntica de 138.12 g/mol, el pico que demuestra que se encuentra en solución es el de 138.07 m/z con aproximadamente 85% de abundancia relativa en el caso del AOH, 38% en el caso del AMH y 62% en el caso del APH. El pico base, que es la especie en mayor abundancia, se muestra a 120.02 m/z con aproximadamente 100% de abundancia relativa en el caso del AOH, a 92.06 m/z con aproximadamente 100% de abundancia relativa en el caso del AMH y a 121.05 m/z con aproximadamente 100% de abundancia relativa en el caso del APH. Algo que también se debe recalcar es que la base de datos identificó con un 80.62% de probabilidad que en efecto, era AOH a el tiempo de retención de 5.38 min, por otro lado, en el caso del AMH, no identificó la diferencia en la posición e identificó la molécula como AOH en un 77.93% a un tiempo de retención de 5.32 min y finalmente para el APH, identificó correctamente al cambio de posición, con un 65.84%, identificándolo como se puede mostrar en la última imagen de la tabla como ácido *p*-hidroxibenzoico a un tiempo de retención de 6.10 min.

Este estudio confirmó exitosamente y primeramente, que de los polímeros están liberando los principios activos y en segundo lugar, que el cambio de posición de las moléculas, al igual que en la CLAR, produce un cambio en los tiempos de retención y en el modo en que se fragmentan las moléculas.

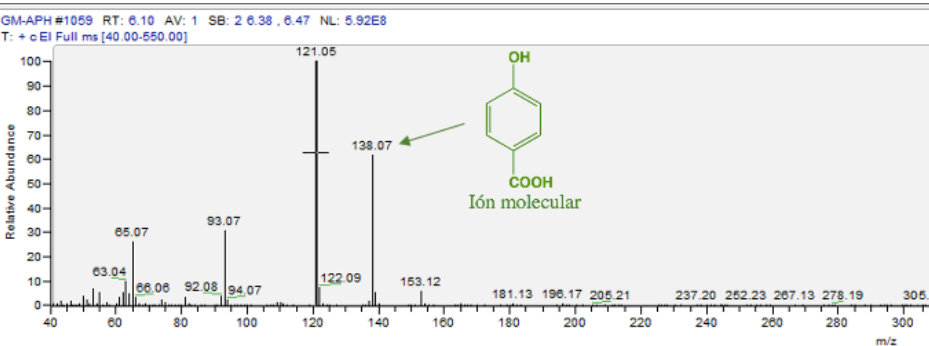
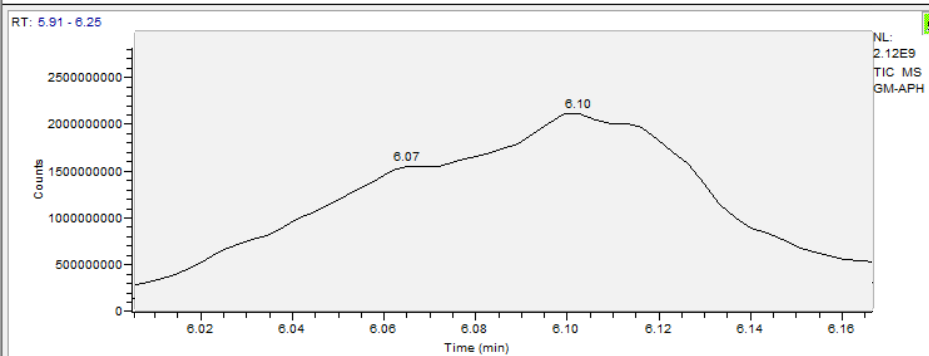
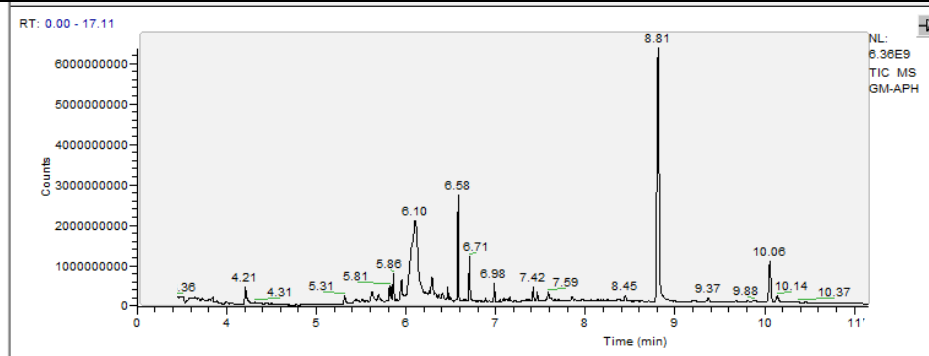
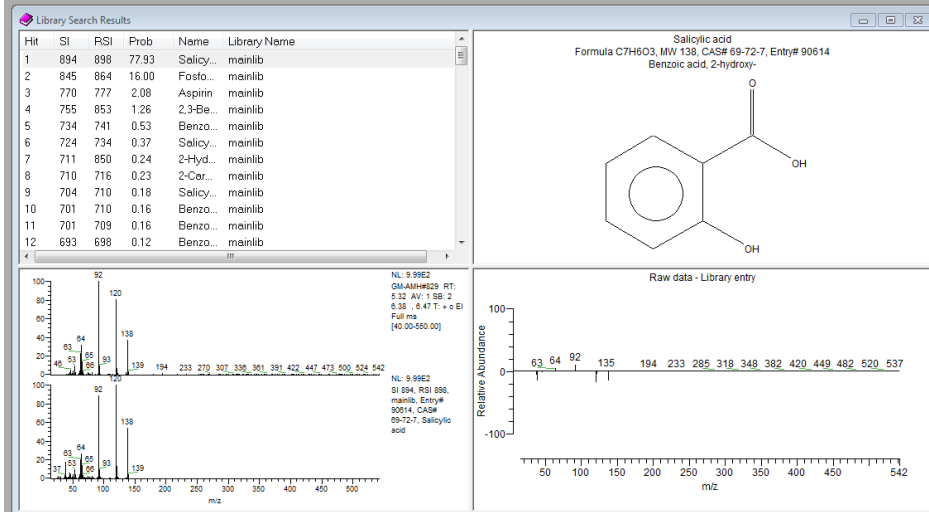
Tabla 17. Cromatogramas y espectros de masas de liberaciones a pH 7.4 del poli(MAOB) siendo su producto de hidrólisis el AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico), del poli(MAMB) siendo su producto de hidrólisis el AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) y del poli(MAPB) siendo su producto de hidrólisis el el APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) mediante GC/MS.

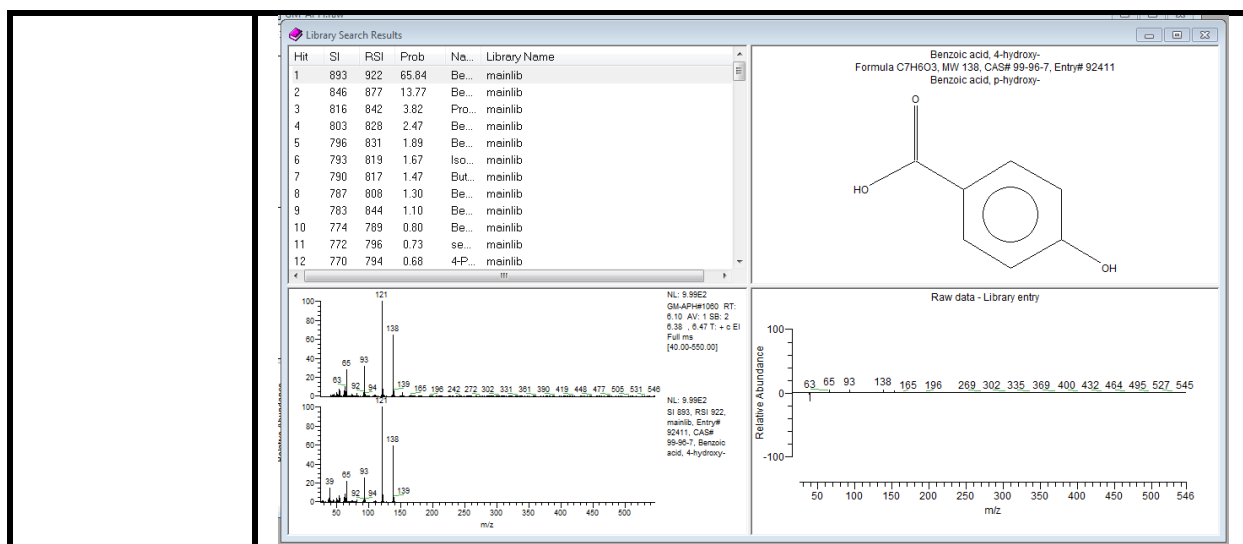


Ácido *m*-hidroxibenzoico



Ácido *p*-hidroxibenzoico





4.5 Rectas de calibración por CLAR

4.5.1 Recta de ácido *o*-hidroxibenzoico (AOH) en pH 7.4

Las rectas de calibración realizadas por triplicado para cada pH y para cada polímero se muestran en el apéndice.

4.6 Estudios biológicos

4.6.1 Prueba de susceptibilidad por difusión en discos

Inhibición bacteriana en *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*

Para la prueba se tuvo como resultado un halo de inhibición de 20 mm de diámetro en cultivo de *S. epidermidis* y un halo de inhibición de 16 mm de diámetro en el cultivo de *E. coli* con el poli(MAOB), para los otros polímeros no se mostraron halos destacables en *E. coli* y no hubo actividad en *S. epidermidis* con los comprimidos de 20 mg.

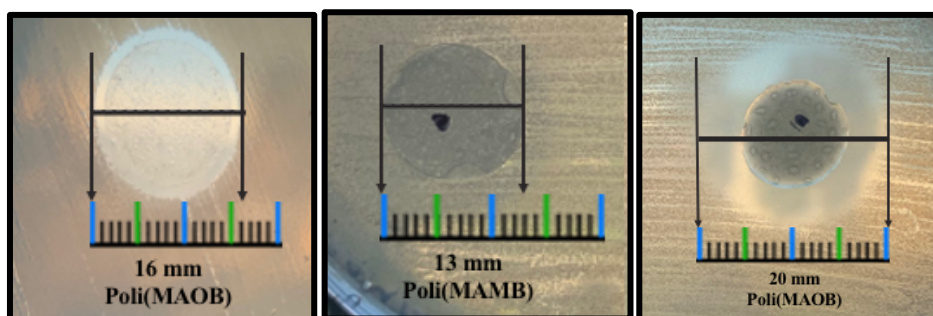


Figura 49. Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAOB) con cepas de *E. coli* (izquierda) y antibiogramas de poli(MAMB) sin inhibición (centro) y poli(MAOB) (derecha) en *S. epidermidis* en agar Mueller Hinton.

Inhibición bacteriana en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*

Se le realizó la prueba de susceptibilidad por difusión en discos al poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) en cajas Petri con agar Mueller-Hinton sembradas con *Candida albicans*, se emplearon sensidiscos de ampicilina de 10 μ g como control a los que *C. albicans* no fue susceptible, en la **Tabla 18**, se muestran los diámetros de los halos de inhibición y en la **Figura 50** se muestran las imágenes de la prueba.

Tabla 18. Diámetros de los halos de inhibición antibiogramas del poli(MAOB), poli(MAMB) y MAPB en cepas de *C. albicans* sembradas en agar Mueller Hinton.

Polímero	Inhibición
Poli(MAOB) n = 5	15 mm 13 mm 15 mm 14 mm 16 mm
Poli(MAMB) n = 3	Sin inhibición
Poli(MAPB) n = 3	Sin inhibición

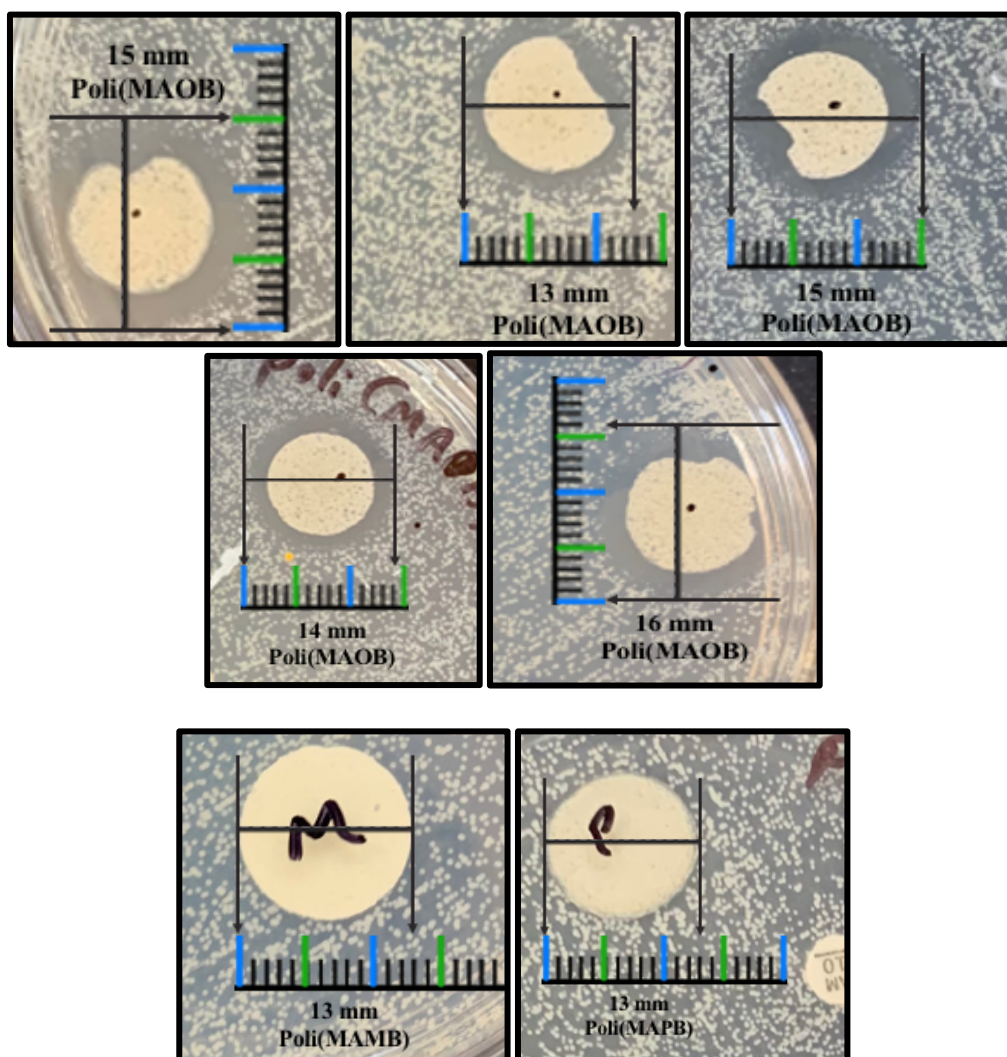


Figura 50. Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAOB) arriba y poli(MAMB) y poli(MAPB) a la abajo en cepas de *C. albicans* sembradas en agar Mueller Hinton.

En cuanto a la prueba de susceptibilidad por difusión en discos al poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) en cajas Petri con agar Mueller-Hinton sembradas con *Escherichia coli*, se emplearon sensidiscos de ampicilina de 10 µg como control a los que *E. coli* no fue susceptible, en la **Figura 51**, se muestran las imágenes de la prueba en los cuales no presentaron halos de inhibición tanto poli(MAMB) como poli(MAPB), mientras que la actividad del poli(MAOB) con *E. coli* fue evaluada en la sección anterior. Las bacterias, como *E. coli*, se caracterizan por una membrana externa que proporciona a la célula una superficie hidrófila capaz de excluir ciertas moléculas hidrófobas, por lo que imparte una resistencia intrínseca de estas bacterias a los compuestos antimicrobianos (Eaton, Fernandes, Pereira, Pintado, & Xavier Malcata, 2008). Pequeños compuestos fenólicos, como el AOH, AMH y APH, atravesarían fácilmente la membrana y ejercerían su actividad antimicrobiana (Ikigai, Nakae, Hara, & Shimamura, 1993).

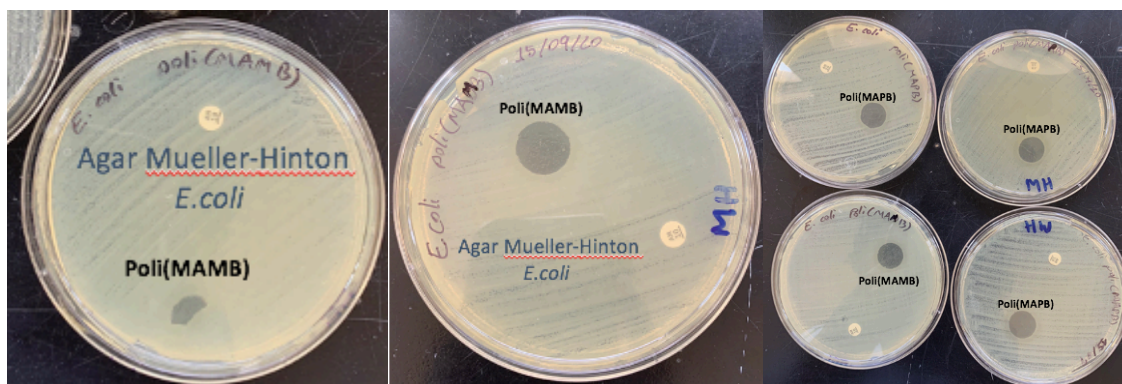


Figura 51. Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAMB) y poli(MAPB) en cepas de *E. coli* sembradas en agar Mueller Hinton.

Finalmente en cuanto a la prueba de susceptibilidad por difusión por discos al poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) en cajas Petri con agar Mueller-Hinton sembradas con *Staphylococcus aureus*, se emplearon sensidiscos de ampicilina de 10 µg como control a los que *S. aureus* fue susceptible, en la **Figura 52**, se muestran las imágenes de la prueba en los cuales no presentaron halos de inhibición tanto poli(MAMB) como poli(MAPB), mientras que la actividad del poli(MAOB) con *S. aureus* se evaluó con fragmentos de un comprimido a los cuales fue susceptible la cepa de *S. aureus* (la prueba con esta cepa se estudiará más a detalle mediante la prueba de CMI en placa de 96 pocillos en la sección siguiente).

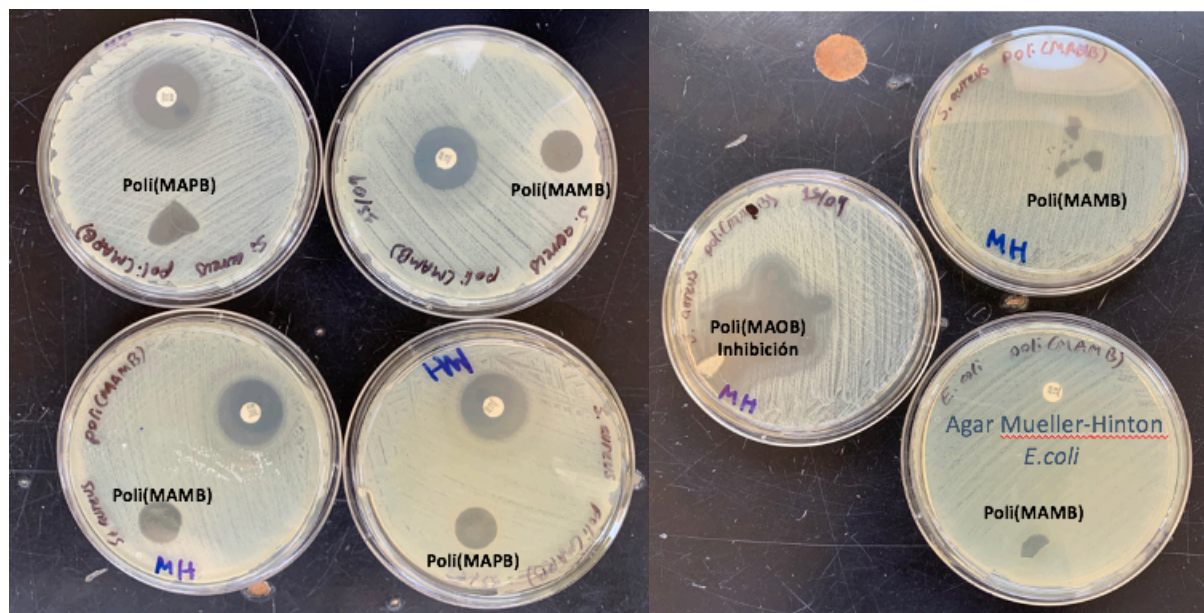


Figura 52. Cajas Petri con antibiogramas del poli(MAMB) y poli(MAPB) en cepas de *S. aureus* sembradas en agar Mueller Hinton.

4.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) en placa de 96 pocillos en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

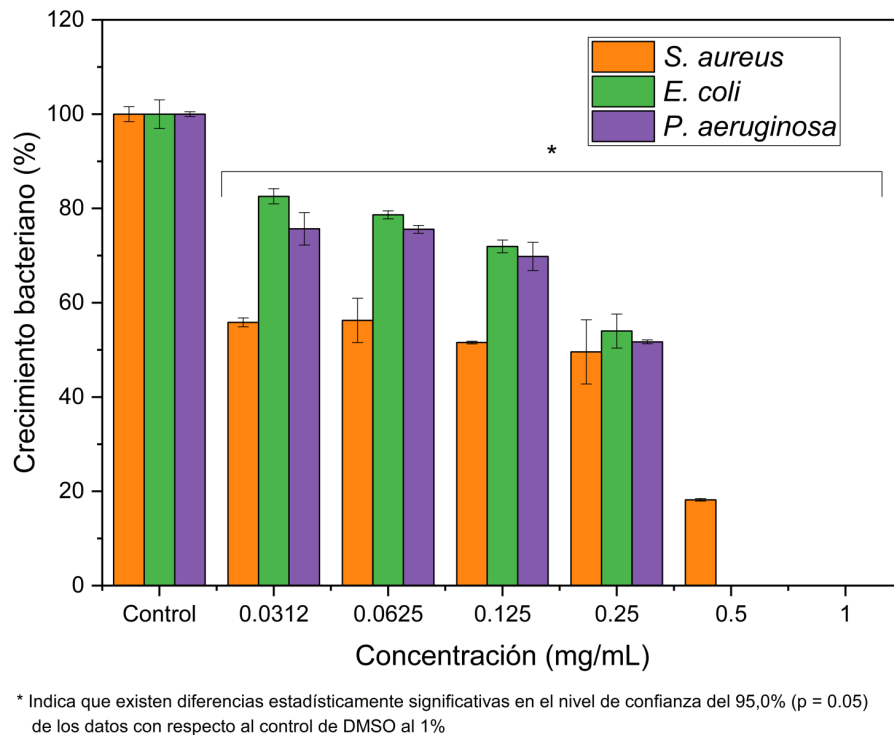
El crecimiento de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* se midieron en presencia de los polímeros poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a varias concentraciones, de 0.03125 a 1 mg/mL. Este rango de concentración fue seleccionado en base a datos previos reportados en la literatura para la inhibición de ácidos fenólicos (Lee, Jenner, Low, & Lee, 2006).

Iniciando con el poli(MAOB) y como se muestra en la **Gráfica 8**, el crecimiento de las tres cepas fue completamente inhibido a una concentración de 1 mg/mL. En el caso de las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron de igual manera inhibidas en su totalidad a una concentración de 0.5 mg/mL, mientras que a esta misma concentración se inhibió un 82% a la cepa de *S. aureus*. Siendo estas las concentraciones en las que se mostró un 100% de inhibición, sus CMI, como se muestra visualmente en la **Figura 53, 54 y 55**.

Un posible mecanismo para explicar la acción antimicrobiana del AOH contra la cepa *S. aureus* es la hiperacidificación en la interfase de la membrana plasmática (Vattem, Lin, Ghaedian, & Shetty, 2005) como consecuencia de la disociación de los ácidos. Esta hiperacidificación alteraría el potencial de la membrana celular, haciéndola más permeable, además de afectar la bomba de ATPasa de sodio-potasio implicada en la síntesis de ATP (Vattem et al., 2005). También, se sabe por la literatura que a una concentración superior a los niveles plasmáticos terapéuticos (0.69 mg/mL) conduce a la regulación a la baja de la gluconeogénesis y la glucólisis en *S. aureus* (Pomposiello et al., 2001).

En cuanto a la adherencia, el AOH a niveles terapéuticos reduce la unión de fibronectina en *S. aureus* y la adherencia de *E. coli* en catéteres (B. F. Farber & Wolff, 1993; Bruce F. Farber & Wolff, 1992). Mientras que, a concentraciones levemente superiores al nivel plasmático

terapéutico, reduce la producción de fimbrias en *E. coli* (Kupferwasser et al., 2003; Muller et al., 1998) y en concentraciones aún más altas, también reduce su producción de hemaglutinina (Kang et al., 1998). También se sabe que en el caso de *E. coli* y *P. aeruginosa*, se evita la formación de biofilms a concentraciones de 0.01 mg/mL (Prithiviraj et al., 2005; Vila & Soto, 2012)



Gráfica 8. Respuesta de crecimiento (%) de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAOB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.

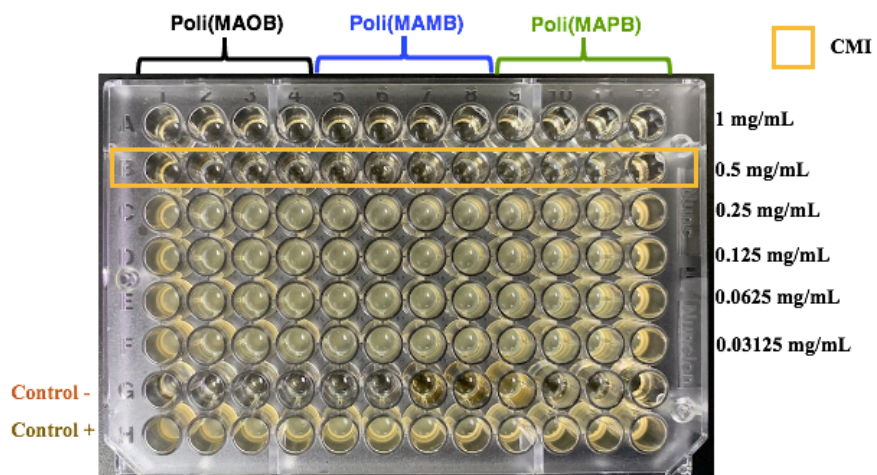


Figura 53. Interpretación de las pruebas de CMI en cepa de *S. aureus* (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).

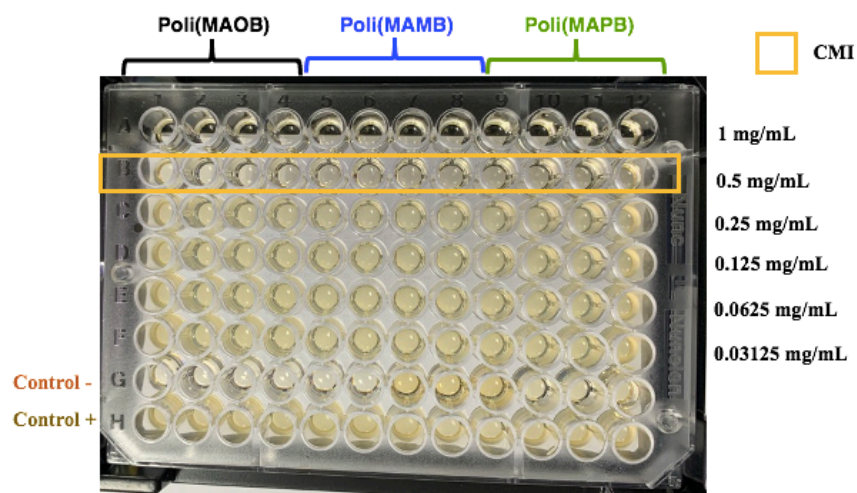


Figura 54. Interpretación de las pruebas de CMI en cepa de *E. coli* (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).

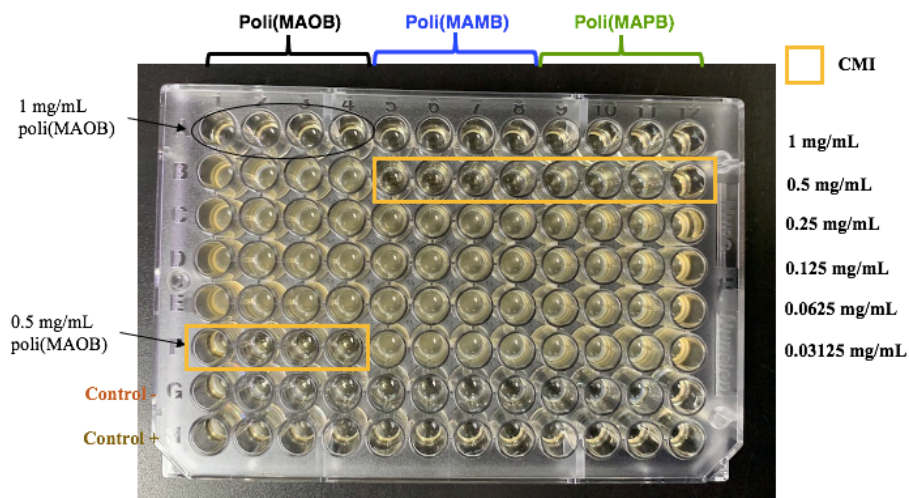
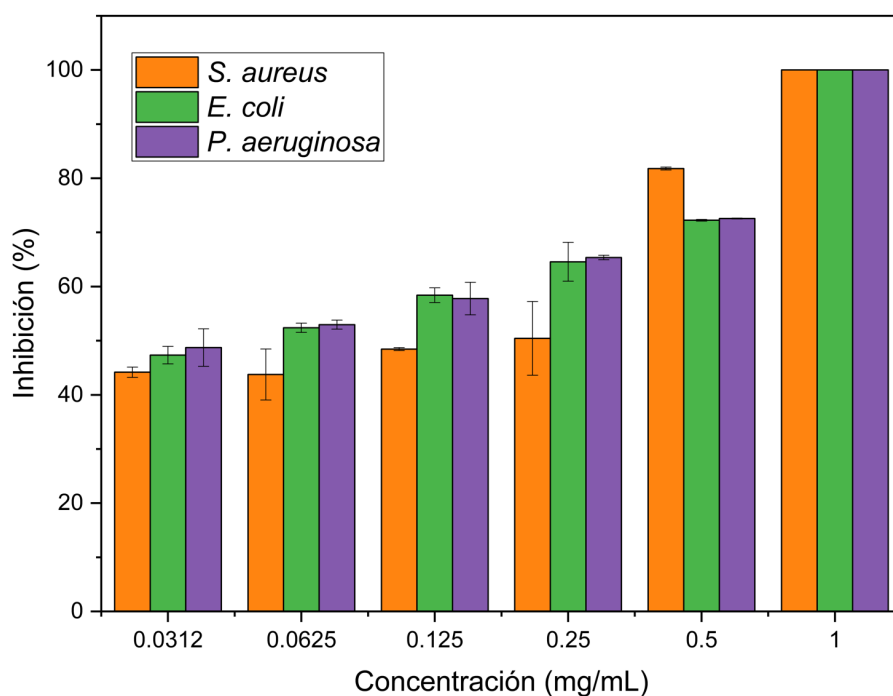


Figura 55. Interpretación de las pruebas de CMI en cepa de *P. aeruginosa* (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition, n.d.*).

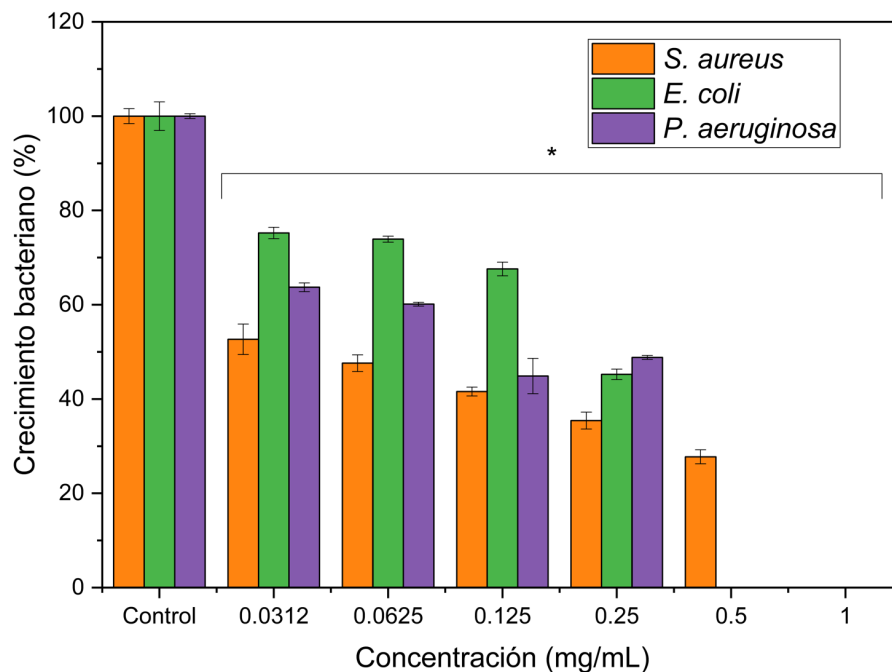
Se les realizó un análisis estadístico a los datos ($n = 3$) arrojados por el poli(MAOB) en el software estadístico SigmaPlot y en Excel, se utilizó un ANOVA de 1 y 2 vías y se analizaron los pares de medias con la comparación múltiple de Bonferroni. El ANOVA 1 vía arrojó una $p = 1.65 \times 10^{-13}$ para la cepa de *S. aureus*, $p = 3.57 \times 10^{-18}$ para la cepa de *E. coli* y una $p = 1.25 \times 10^{-18}$ para la cepa de *P. aeruginosa*, que al ser menores a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 7 variables (entre concentraciones y el control de DMSO al 1%) con nivel de confianza del 95.0%, mientras que la comparación múltiple de Bonferroni, mostró una diferencia estadísticamente significativa entre todas las concentraciones contra el control de DMSO 1%, como se puede apreciar en la **Gráfica 8**, en el que se encuentran marcados con un asterisco.



Gráfica 9. Porcentaje de inhibición de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAOB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.

Para poder apreciar mejor los resultados, se presenta la **Gráfica 9**, con los porcentajes de inhibición, partiendo de los datos ya mostrados anteriormente del crecimiento, donde es claramente observable el aumento de inhibición mientras aumenta la concentración del poli(MAOB).

En cuanto a el poli(MAMB), el crecimiento de las tres cepas fue muy similar al poli(MAOB), ya que fue completamente inhibido a una concentración de 1 mg/mL, como se muestra en la **Gráfica 10**. En el caso de las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron de igual manera inhibidas en su totalidad a una concentración de 0.5 mg/mL, mientras que a esta misma concentración se inhibió un 72% a la cepa de *S. aureus*. Siendo estas las concentraciones en las que se mostró un 100% de inhibición, sus CMI, como se muestra visualmente en la **Figura 53, 54 y 55**.

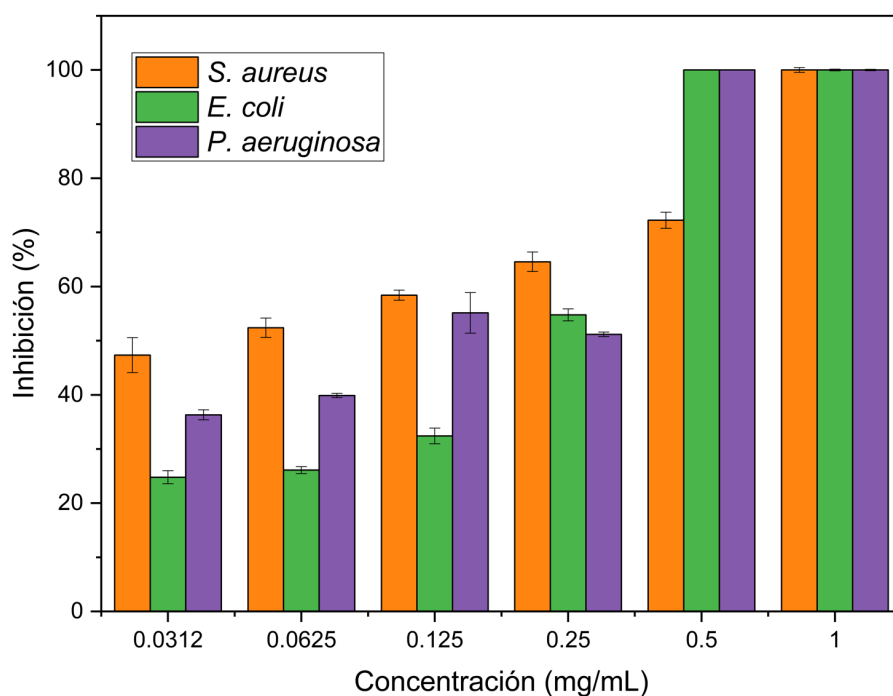


* Indica que existen diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0% ($p = 0.05$) de los datos con respecto al control de DMSO al 1%

Gráfica 10. Respuesta de crecimiento (%) de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAMB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.

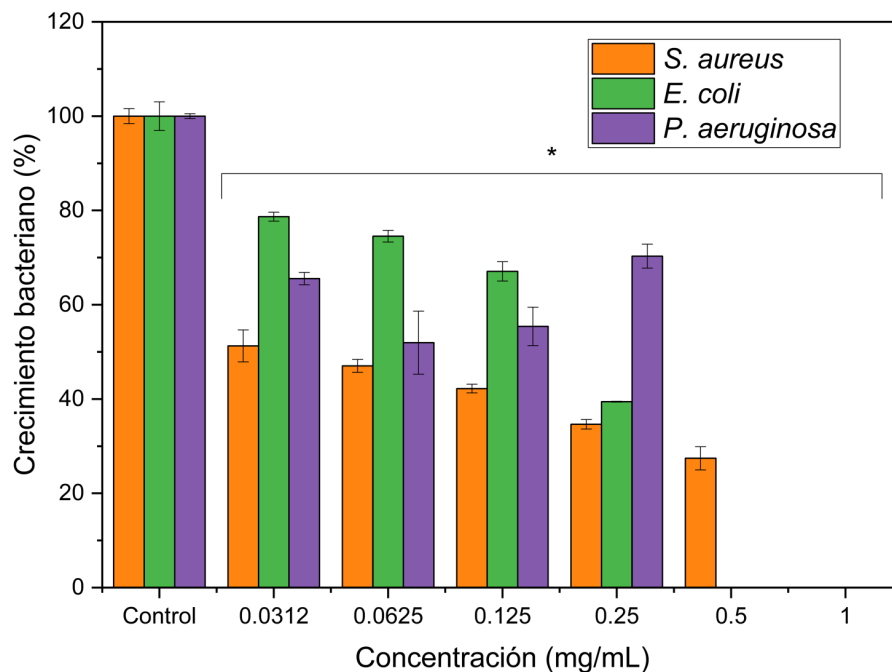
De igual manera, se les realizó un análisis estadístico a los datos ($n = 3$) arrojados por el poli(MAMB). El ANOVA 1 vía arrojó una $p = 2.35 \times 10^{-19}$ para la cepa de *S. aureus*, $p = 7.76 \times 10^{-20}$ para la cepa de *E. coli* y una $p = 4.34 \times 10^{-19}$ para la cepa de *P. aeruginosa*, que al ser menores a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 7 variables (entre concentraciones y el control de DMSO al 1%) con nivel de confianza del 95.0%, mientras que la comparación múltiple de Bonferroni, mostró una diferencia estadísticamente significativa entre todas las concentraciones contra el control de DMSO 1%, como se puede apreciar en la **Gráfica 10**.

A continuación, se presenta la **Gráfica 11** de inhibición, donde es claramente observable el aumento de inhibición mientras aumenta la concentración del poli(MAMB).



Gráfica 11. Porcentaje de inhibición de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAMB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.

Finalmente, en el caso del poli(MAPB), el crecimiento de las tres cepas fue muy similar al de los dos polímeros anteriores, ya que fue completamente inhibido a una concentración de 1 mg/mL, como se muestra en la **Gráfica 12**. En el caso de las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron de igual manera inhibidas en su totalidad a una concentración de 0.5 mg/mL, mientras que a esta misma concentración se inhibió un 73% a la cepa de *S. aureus*.

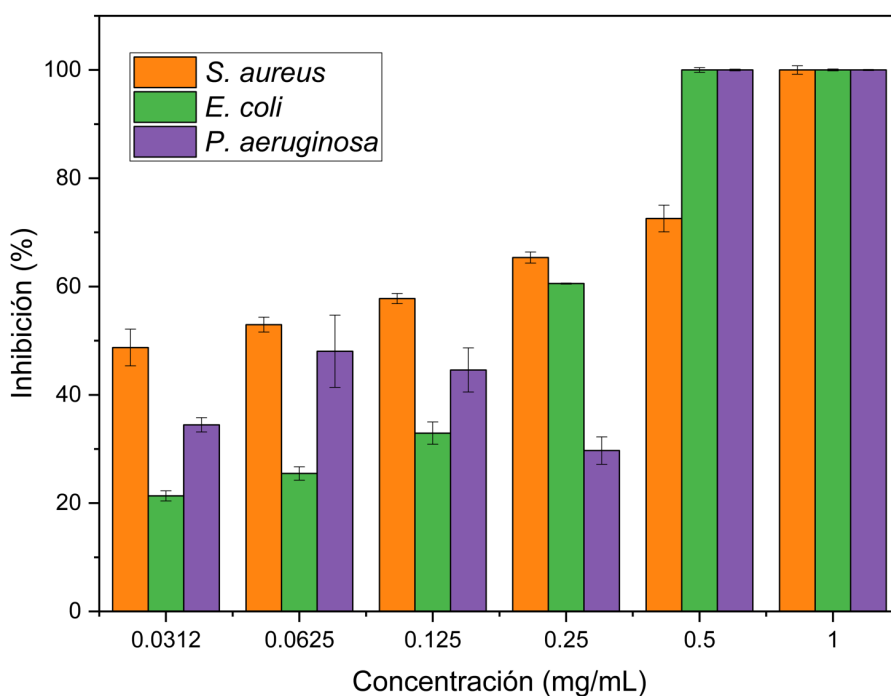


* Indica que existen diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0% ($p = 0.05$) de los datos con respecto al control de DMSO al 1%

Gráfica 12. Respuesta de crecimiento (%) de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAPB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.

El ANOVA 1 vía arrojó una $p = 8.5 \times 10^{-20}$ para la cepa de *S. aureus*, $p = 1.19 \times 10^{-19}$ para la cepa de *E. coli* y una $p = 7.92 \times 10^{-15}$ para la cepa de *P. aeruginosa*, que al ser menores a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 7 variables (entre concentraciones y el control de DMSO al 1%) con nivel de confianza del 95.0%, mientras que la comparación múltiple de Bonferroni, mostró una diferencia estadísticamente significativa entre todas las concentraciones contra el control de DMSO 1%, como se puede apreciar en la **Gráfico 12**.

A continuación, se presenta la **Gráfico 13**, del porcentaje de inhibición, donde es claramente observable el aumento de inhibición mientras aumenta la concentración del poli(MAPB).



Gráfica 13. Porcentaje de inhibición de las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia del poli(MAPB), a diferentes concentraciones de 0.03125 a 1 mg/mL.

Debido a que se obtuvieron respuestas similares en los tres polímeros, se realizó un ANOVA 2 vías, en la cual se comparaban los tres polímeros contra las seis concentraciones empleadas, en cada cepa que se empleó. Este análisis estadístico, arrojó una $p = 0.21$ para la cepa de *S. aureus*, $p = 0.03$ para la cepa de *E. coli* y una $p = 0.21$ para la cepa de *P. aeruginosa*, que al ser mayores la de *S. aureus* y la de *P. aeruginosa* a 0.05 nos dice que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres polímeros y podemos decir que sus efectos sobre estas dos cepas es igual, mientras que en el caso de *E. coli*, al ser menor a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres polímeros y podemos decir que sus efectos sobre esta cepa es diferente para cada polímero, siendo el poli(MAMB) el más efectivo contra esta cepa.

Estos resultados son prometedores, ya que entre los microorganismos multi-resistentes que pueden invadir lesiones en quemaduras y dispositivos médicos como cateteres, los microorganismos más identificados son *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y especies de enterobacterias como *E. coli* (Burns., 2015; Hassen A F, Khalifa S B, 2014; Öncül O, Öksüz S, Acar A, Ülkür E, Turhan V, Uygur F, 2014).

4.6.3 Ensayo de MTT para evaluación de citotoxicidad

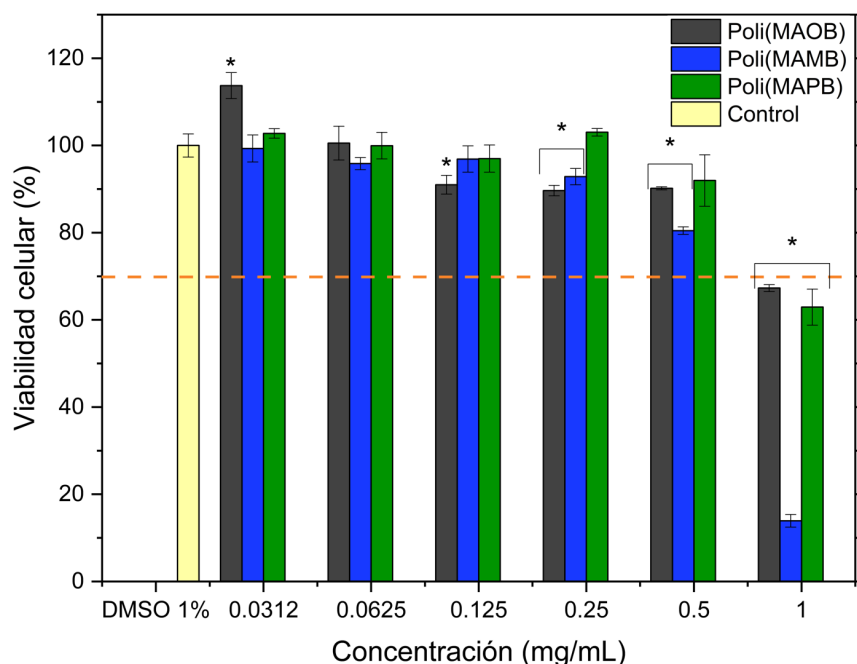
Los ensayos de citotoxicidad de los polímeros, monómeros y principios activos fueron realizados en fibroblastos de ratón BALB/3T3 a varias concentraciones (0.03125 a 1 mg/mL y en el caso de los principios activos desde 0.125 a 1 mg/mL). Este rango de concentración fue seleccionado en base a datos previos reportados en la literatura para la ensayos de citotoxicidad de poli(ésteres anhidros) a base de ácido salicílico (Snyder, Cao, & Uhrich, 2019).

Se les realizó un análisis estadístico a los datos ($n = 3$) arrojados de los tres polímeros en el software estadístico SigmaPlot y en Excel, se utilizó un ANOVA de 1 y 2 vías y se analizaron los pares de medias con la comparación múltiple de Bonferroni. El ANOVA 1 vía arrojó una $p = 5.69 \times 10^{-13}$ para el poli(MAOB), $p = 9.08 \times 10^{-19}$ para el poli(MAMB) y una $p = 2.93 \times 10^{-11}$ para el poli(MAPB), que al ser menores a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las seis concentraciones de los tres diferentes polímeros y el control de DMSO al 1%, con nivel de confianza del 95.0%, mientras que la comparación múltiple de Bonferroni, mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL contra el control de DMSO 1%, como se puede apreciar en la **Gráfica 14**.

El ANOVA 2 vías mostró que no existe una diferencia estadísticamente entre los polímeros, ya que su $p = 0.16$, mientras que si existió una diferencia de la concentración 1 mg/mL del

poli(MAMB) con los otros dos polímeros. La concentración de 1 mg/mL del poli(MAMB) al haber sido la más citotóxica fue corroborada con la realización de un triplicado extra (**Figura 56**, $n = 6$), demostrándose el mismo efecto del polímero sobre las células.

Sin embargo, tomando en cuenta que de acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009, para la evaluación biológica de dispositivos médicos, cuando hay una reducción en la viabilidad celular de más del 30%, se considera que hay efectos citotóxicos; sólo las concentraciones más altas de estos polímeros sobrepasaron este nivel.



Gráfica 14. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 en presencia de los polímeros poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h (* indica una disminución significativa del control DMSO 1%, $p < 0.05$).

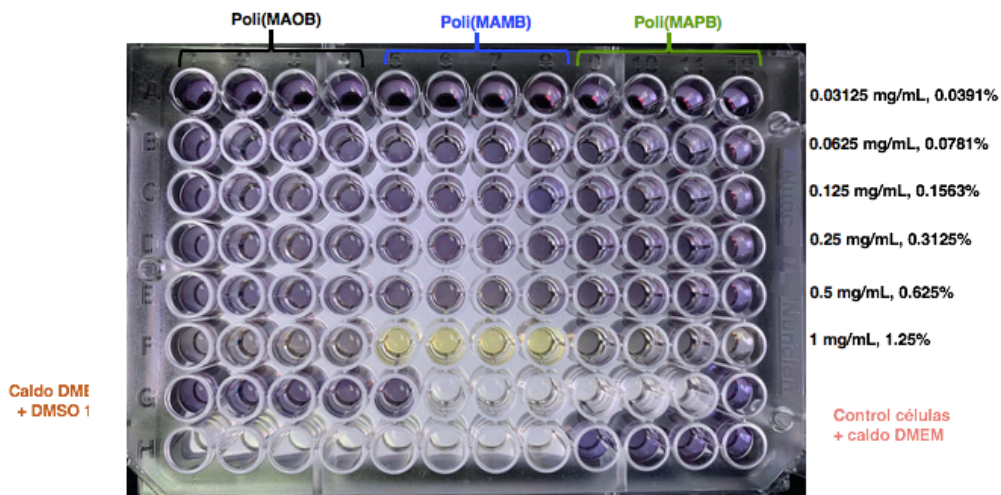
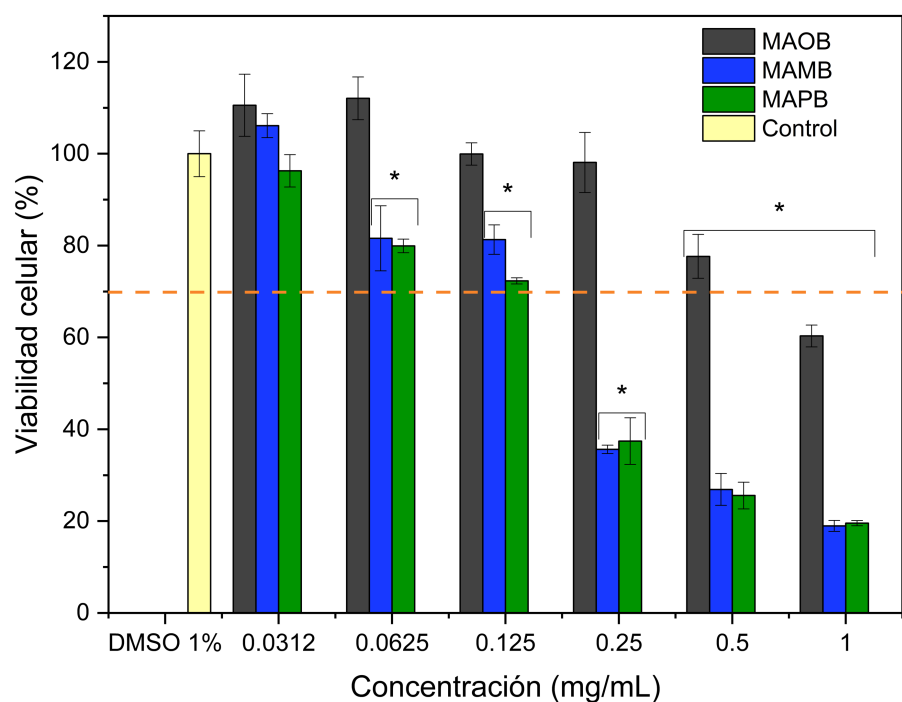


Figura 56. Placa de 96 pocillos con la prueba de MTT de los polímeros poli(MAOB), poli(MAMB) y poli(MAPB) a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h.

En el caso de los monómeros, de igual manera se les realizó un análisis estadístico a los datos ($n = 3$) arrojados de los tres monómeros, se utilizó un ANOVA de 1 y 2 vías y se analizaron los pares de medias con la comparación múltiple de Bonferroni. El ANOVA 1 vía arrojó una $p = 2.35 \times 10^{-09}$ para el MAOB, $p = 9.08 \times 10^{-19}$ para el MAMB y una $p = 2.88 \times 10^{-18}$ para el MAPB, que al ser menores a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las seis concentraciones de los tres diferentes monómeros y el control de DMSO al 1%, con nivel de confianza del 95.0%, mientras que la comparación múltiple de Bonferroni, mostró una diferencia estadísticamente significativa nuevamente entre las concentraciones 0.125, 0.25, 0.5 y 1, e incluso en la de 0.0625 mg/mL contra el control de DMSO 1%, como se puede apreciar en la **Gráfica 15**.

El ANOVA 2 vías mostró que existe una diferencia estadísticamente entre los efectos de los monómeros sobre las células, ya que su $p = 0.0003$, esto se puede apreciar visualmente en la **Gráfica 15**, ya que a partir de la concentración de 0.0625 hasta 1 mg/mL del MAMB y MAPB se

aprecia una diferencia muy marcada. A partir de la concentración de 0.25 hasta 1 mg/mL la viabilidad celular disminuyó en más del 30%, por lo que a esas concentraciones son considerados citotóxicos, en el caso del MAOB solo en la máxima concentración, se mostró una disminución mayor al 30% aunque no tan drástica como en el caso de los otros dos monómeros, siendo este último el menos citotóxico.



Gráfica 15. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 en presencia de los monómeros MAOB, MAMB y MAPB a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h (* indica una disminución significativa del control DMSO 1%, $p < 0.05$).

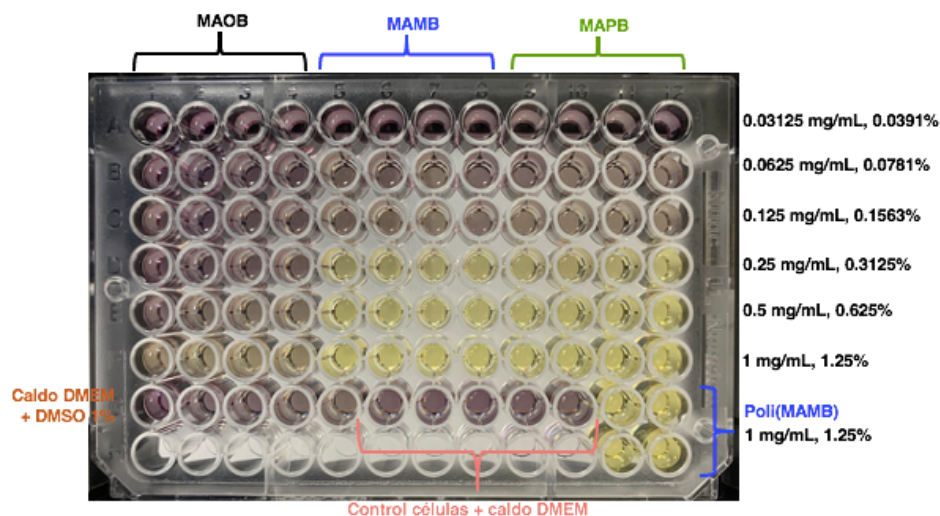
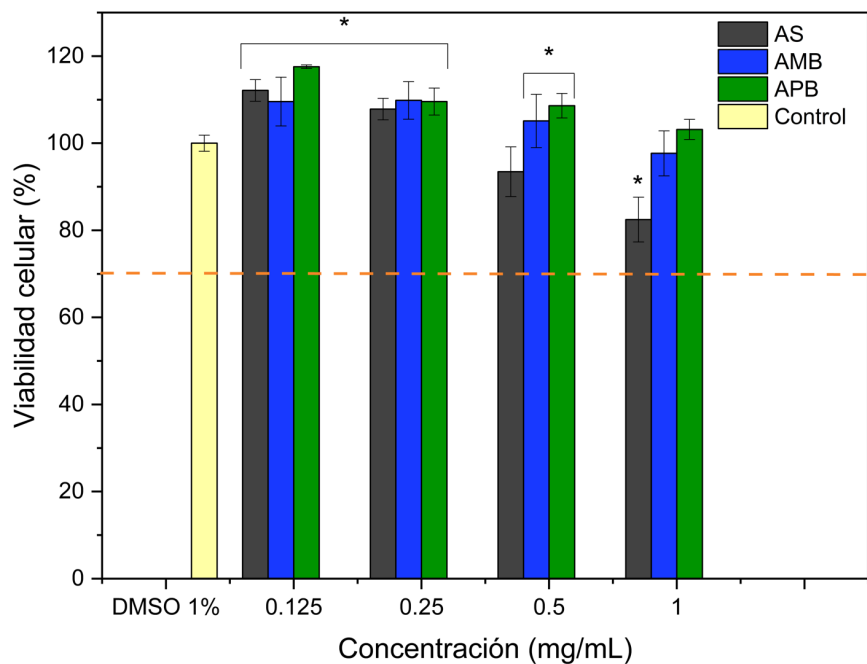


Figura 57. Placa de 96 pocillos con la prueba de MTT de los monómeros MAOB, MAMB y MAPB a varias concentraciones (de 0.03125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h.

Finalmente, para el caso de los principios activos. El ANOVA 1 vía arrojó una $p = 2.02 \times 10^{-07}$ para el AOH, $p = 0.0006$ para el AMH y una $p = 2.37 \times 10^{-06}$ para el APH, que al ser menores a 0.05 nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las cuatro concentraciones de los tres diferentes principios activos y el control de DMSO al 1%, con nivel de confianza del 95.0%, mientras que la comparación múltiple de Bonferroni, mostró una diferencia estadísticamente significativa positiva entre las concentraciones 0.125 y 0.25 mg/mL de los tres principios activos con respecto al control, a 0.5 mg/mL solo para el AMH y APH y solo en el caso del AOH a 1 mg/mL hay una diferencia estadísticamente con el control, como se puede apreciar en la **Gráfico 16**.

El ANOVA 2 vías mostró que no existe una diferencia estadísticamente entre los efectos de los principios activos sobre las células, ya que su $p = 0.06$, esto se puede apreciar visualmente la **Gráfico 16**, ya que no se aprecia una diferencia muy marcada. Cabe recalcar que en ninguna de

las concentraciones probadas, la viabilidad celular disminuyó en más del 30%, por lo que a esas concentraciones no son considerados citotóxicos.



Gráfica 16. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos de ratón BALB/3T3 en presencia de los principios activos AOH, AMH y APH a varias concentraciones (de 0.125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h (* indica una disminución significativa del control DMSO 1%, $p < 0.05$).

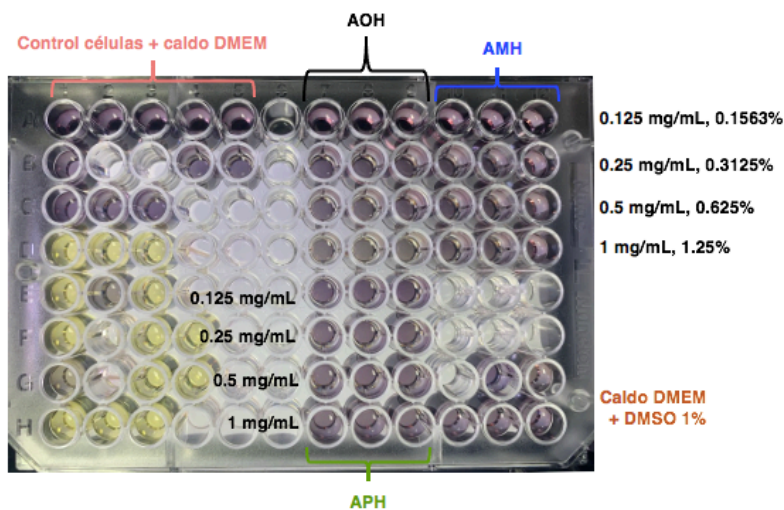


Figura 58. Placa de 96 pocillos con la prueba de MTT de los principios activos AOH, AMH y APH a varias concentraciones (de 0.125 a 1 mg/mL) durante una exposición de 24 h.

5. Conclusiones

En cuanto a la parte de síntesis del proyecto se refiere, se lograron obtener los monómeros MAOB, MAMB, MAPB con buenos porcentajes de rendimiento y se logró optimizar los porcentajes de rendimiento de sus tres respectivos polímeros.

Se evaluó la pureza de todos los productos obtenidos mediante TLC y RMN, concluyendo que las impurezas presentadas por el poli(MAOB) y poli(MAPB), eran el producto de hidrólisis de estos polímeros; AOH y APH, respectivamente. Por su parte el MAMB disminuyó las bandas de humedad y en el caso del MAOB desaparecieron completamente bandas de impurezas y las de humedad disminuyeron drásticamente, en el caso el del MAPB y poli(MAMB) no se detectaron impurezas en ninguna de las dos pruebas.

En cuanto a la caracterización por espectroscopia de infrarrojo en complementación con la RMN- ^1H y la espectrofotometría UV-vis, se logró comprobar que se estaba trabando con diferentes isómeros, ya la posición del ácido carboxílico con respecto al éster, tanto en lo monómeros, como en los polímeros, mostró diferencias en los espectros obtenidos.

El método de cuantificación por CLAR, resultó ser ideal para los principios activos liberados de nuestros polímeros; especialmente para la posición *m* y *p*, mientras que el poli(MAOB) liberó el 100% del AOH disponible a pH 6.8 y 7.4, comprobando el mecanismo de hidrólisis propuesto por (Bender, 2002), el cual dice que debido a una catálisis básica general intramolecular la velocidad de la hidrólisis puede llegar a ser más veloz en el caso del AAS, el poli(MAPB) liberó un poco más del 70% al pH 7.4 y finalmente el poli(MAMB) no liberó más del 15% de el AMH disponible en ninguno de los pH muestreados, presumiblemente por la baja solubilidad del principio activo que reduce la fuerza impulsora que acelera la degradación de los comprimidos, lo que nos lleva a

confirmar que existe una respuesta muy marcada de los polímeros con respecto al cambio de posición del ácido carboxílico y al pH del medio

Se encontró actividad de inhibición bacteriana para el poli(MAOB) con cepas de *S. epidermidis*, *E. coli*, *C. albicans* y *S. aureus* en cuanto a la prueba de susceptibilidad por difusión por discos.

En la prueba de CMI, para el caso de las tres cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, fueron muy susceptible los tres polímeros inhibiendo en un 100% a una concentración de 1 mg/mL, anteriormente antes de modificar el método, el poli(MAOB) había inhibido en un 92% a 1 mg/mL, el poli(MAMB) un 48% y el poli(MAPB) un 67% con *S. aureus*. Por lo que se puede aseverar que la presencia del DMSO en la prueba, mejoró drásticamente la solubilidad de los polímeros y por ende la hidrólisis de los mismo, logrando mejores resultados, ya que incluso a concentraciones de 0.5 mg/mL los tres polímeros aún inhibieron en un 100% las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Finalmente, como se observó en la evaluación de la citotoxicidad de monómeros y polímeros, el grado de conversión de los dobles enlaces entre los carbonos que se convierten en enlaces simples debido a la polimerización, influye directamente en las propiedades físicas, mecánicas y como se evaluó en esta prueba, las propiedades biológicas de los materiales con los que se trabajó, en el caso de los polímeros solo en la concentración más elevada hubo destacada citotoxicidad en el caso del poli(MAMB) y solo un poco por arriba del 30% en el caso del poli(MAOB) y poli(MAPB), mientras que en el caso de los monómeros, este efecto inició desde la concentración de 0.25 hasta la de 1 mg/mL, lo que nos indica que, los materiales más citotóxicos con los que se trabajó fueron los monómeros, seguidos por los polímeros con una citotoxicidad intermedia en la concentración más alta y los principios activos por otra parte no presentaron efectos negativos a ninguna de las concentraciones probadas. Debido a esto, los polímeros con los que se trabajó en esta tesis son potenciales candidatos para su aplicación en otras formas farmacéuticas como por

ejemplo hidrogeles tópicos destinados a prevenir y/o tratar infecciones y procesos analgésico-inflamatorios. Otra alternativa es que podrían emplearse para su injerto en dispositivos médicos (catéteres, hilos de sutura, etc.) para prevenir la colonización bacteriana o la producción de biofilms.

.

6. Referencias bibliográficas

- Abbas, S., Greige-Gerges, H., Karam, N., Piet, M.-H., Netter, P., & Magdalou, J. (2010). Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25(6), 568–577. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-013>
- Ackermann, B. (2007). HPLC for pharmaceutical scientists. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(7), 1344–1344. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.04.001>
- Ahuja, S. (2007). 1 Overview of HPLC method development for pharmaceuticals. *Separation Science and Technology*, 8, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(07\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(07)80007-9)
- Allen, T. M. (2002, October). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 2, pp. 750–763. <https://doi.org/10.1038/nrc903>
- Bender, M. L. (2002). Mechanisms of Catalysis of Nucleophilic Reactions of Carboxylic Acid Derivatives. *Chemical Reviews*, 60(1), 53–113. <https://doi.org/10.1021/CR60203A005>
- Bernas, T., & Dobrucki, J. W. (2000). The role of plasma membrane in bio reduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380(1), 108–116. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1907>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Billardello, B., & Berthod, A. (2002). Chapter 7 Special uses of a support-free liquid stationary phase. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 38, pp. 177–200).

[https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(02\)80010-1](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(02)80010-1)

Burns., M. C. K. (2015). Principles and Practice of Infectious Diseases. In *Elsevier Saunders* (8th ed.). New York.

Caglieri, S. C., & Macaño, H. R. (2010). Estudio Teórico de la Hidrólisis de Ésteres Alifáticos y Aromáticos. *Información Tecnológica*, 21(4), 67–73. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642010000400009>

Campos, R. P. (2002). Quemaduras . *ENFERMERÍA MÉDICO-QUIRÚRGICA*, 1123–1137.

CDC, & Ncird. (n.d.). *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis - CHAPTER 11: Antimicrobial Susceptibility Testing of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae*. Retrieved from <http://www.clsi.org/>

Céspedes Rodríguez, H. R., Camacho Blanco, O., Rodríguez Bencomo, D., & Rivero, Y. (2006). Infecciones relacionadas con el uso de catéter venoso en la unidad de cuidados intensivos pediátricos. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, Vol. 10, pp. 24–33. scielocu.

Claesson, P. M., van der Wal, A., & Fogden, A. (2007). New Techniques for Optimization of Particulate Cleaning. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*, 2, 885–927. <https://doi.org/10.1016/B978-044451664-0/50027-9>

Colín-castro, C., Chávez-heres, T., Magaña, J. J., & Franco-cendejas, R. (2017). Microorganismos bacterianos asociados a infección del torrente sanguíneo en pacientes con quemaduras de un centro de referencia de la Ciudad de México. *Investigación En Discapacidad*, 6(2), 50–56.

da Graça Campos, M., & Markham, K. R. (2007). *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids*. In *Ensino*. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=B-ui-L-ID4gC>

- Dargan, P. I., Wallace, C. I., & Jones, A. L. (2002). An evidence based flowchart to guide the management of acute salicylate (aspirin) overdose. *Emergency Medicine Journal*, Vol. 19, pp. 206–209. <https://doi.org/10.1136/emj.19.3.206>
- Das, D., Srinivasan, S., Brown, F. D., Su, F. Y., Burrell, A. L., Kollman, J. M., ... Convertine, A. J. (2018). Radiant star nanoparticle prodrugs for the treatment of intracellular alveolar infections. *Polym. Chem.*, 9(16), 2134–2146. <https://doi.org/10.1039/C8PY00202A>
- Das, Debobrato, Chen, J., Srinivasan, S., Kelly, A. M., Lee, B., Son, H.-N., ... Stayton, P. S. (2017). Synthetic Macromolecular Antibiotic Platform for Inhalable Therapy against Aerosolized Intracellular Alveolar Infections. *Molecular Pharmaceutics*, 14(6), 1988–1997. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00093>
- Das, Debobrato, Srinivasan, S., Kelly, A. M., Chiu, D. Y., Daugherty, B. K., Ratner, D. M., ... Convertine, A. J. (2016). RAFT polymerization of ciprofloxacin prodrug monomers for the controlled intracellular delivery of antibiotics. *Polym. Chem.*, 7(4), 826–837. <https://doi.org/10.1039/C5PY01704A>
- Eaton, P., Fernandes, J. C., Pereira, E., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108(10), 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2008.04.015>
- Edwards, L. J. (1950). The hydrolysis of aspirin. A determination of the thermodynamic dissociation constant and a study of the reaction kinetics by ultra-violet spectrophotometry. *Transactions of the Faraday Society*, 46(0), 723–735. <https://doi.org/10.1039/TF9504600723>
- Elder, R. L. (1984). The cosmetic ingredient review—a safety evaluation program. *Journal of the*

- American Academy of Dermatology*, Vol. 11, pp. 1168–1174.
- [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(84\)80205-4](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(84)80205-4)
- Escobar J.L., García D.M., Zaldivar D., K. I. (2002). Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 3, 1–25.
- Farber, B. F., & Wolff, A. G. (1993). The use of salicylic acid to prevent the adherence of *Escherichia coli* to silastic catheters. *Journal of Urology*, 149(3), 667–670.
- [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)36176-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)36176-1)
- Farber, Bruce F., & Wolff, A. G. (1992). The Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs to Prevent Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to Medical Polymers. *Journal of Infectious Diseases*, 166(4), 861–865. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.4.861>
- Fennema, O., & Tannenbaum, S. (2010). Fennema Química de los alimentos. In *Química de los Alimentos*.
- Fersht, A. R., & Kirby, A. J. (2002). Hydrolysis of aspirin. Intramolecular general base catalysis of ester hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 89(19), 4857–4863.
- <https://doi.org/10.1021/JA00995A007>
- FOORD, R., JAKEMAN, E., OLIVER, C. J., PIKE, E. R., BLAGROVE, R. J., WOOD, E., & PEACOCKE, A. R. (1970). Determination of Diffusion Coefficients of Haemocyanin at Low Concentration by Intensity Fluctuation Spectroscopy of Scattered Laser Light. *Nature* 1970 227:5255, 227(5255), 242–245. <https://doi.org/10.1038/227242a0>
- Gallardo Gonzalez, R.; Ruiz Pamos, J.G. ; Torres Palomares, R.M.; Diaz Oller, J. (2000). Estado actual del manejo urgente de las quemaduras: Fisiopatología y valoración de la quemadura. *Revista Emergencia*, 13, 122–129.

- Goto, A., Miyamoto, H., Salomon, M., Goto, R., Fukuda, H., Königsberger, E., & Königsberger, L. C. (2011). IUPAC-NIST solubility data series. 90. Hydroxybenzoic acid derivatives in binary, ternary, and multicomponent systems. Part I. Hydroxybenzoic acids, hydroxybenzoates, and hydroxybenzoic acid salts in water and aqueous systems. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(1), 013101. <https://doi.org/10.1063/1.3525876>
- Guo, H. B., He, F., Gu, B., Liang, L., & Smith, J. C. (2012). Time-dependent density functional theory assessment of UV absorption of benzoic acid derivatives. *Journal of Physical Chemistry A*, 116(48), 11870–11879. <https://doi.org/10.1021/jp3084293>
- Hassen A F, Khalifa S B, D. M. (2014). Epidemiological and bacteriological profiles in children with burns. *Burns*, 40, 1040–1045.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *BBA - Biomembranes*, 1147(1), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R)
- Kang, G., Balasubramanian, K. A., Koshi, R., Mathan, M. M., & Mathan, V. I. (1998). Salicylate inhibits fimbriae mediated HEp-2 cell adherence of and haemagglutination by enteroaggregative Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, 166(2), 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13899.x>
- Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2007). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research* 2007 10:5, 10(5), 823–829. <https://doi.org/10.1007/S11051-007-9317-4>
- Khan, S. A., Chatterjee, S. S., & Kumar, V. (2016). Low dose aspirin like analgesic and anti-inflammatory activities of mono-hydroxybenzoic acids in stressed rodents. *Life Sciences*, 148, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.032>

- Kumar Bhardwaj, S. (2015). *A Review: HPLC Method Development and Validation*. Retrieved from <http://www.urpjournals.com>
- Kunin, C. M., Hua, T. H., Guerrant, R. L., & Bakaletz, L. O. (1994). Effect of salicylate, bismuth, osmolytes, and tetracycline resistance on expression of fimbriae by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 62(6), 2178. Retrieved from [/pmc/articles/PMC186495/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC186495/?report=abstract)
- Kunin, C. M., Tong Hua Hua, & Bakaletz, L. O. (1995). Effect of salicylate on expression of flagella by *Escherichia coli* and *Proteus*, *Providencia*, and *Pseudomonas* spp. *Infection and Immunity*, 63(5), 1796–1799. <https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1796-1799.1995>
- Kupferwasser, L. I., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Kupferwasser, D., Xiong, Y.-Q., Palma, M., ... Bayer, A. S. (2003). Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 112(2), 222–233. <https://doi.org/10.1172/jci16876>
- L. J. Wade, J. (2012). 26 1222. In *Química orgánica vol. 2* (pp. 1222–1242).
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157(9), 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.07.004>
- Licea-Claverie, A., Rogel-Hernández, E., López-Sanchez, J.A., Castillo-Arámbula, L.A., Cornejo-Bravo, J. M. (2003). Designed Monomers and Polymers A facile synthesis route for carboxyaryl- methacrylates : a way to obtain aromatic polyelectrolytes A facile synthesis route for carboxyaryl-methacrylates : a way to obtain aromatic polyelectrolytes. *Designed Monomers and Polymers*, 6, 67–80. <https://doi.org/10.1163/156855503321127547>
- Lona-Reyes, J. C., López-Barragán, B., Celis de la Rosa, A. de J., Pérez-Molina, J. J., Ascencio-

- Esparza, E. P., Lona-Reyes, J. C., ... Ascencio-Esparza, E. P. (2016). Bacteriemia relacionada con catéter venoso central: incidencia y factores de riesgo en un hospital del occidente de México. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 73(2), 105–110. <https://doi.org/10.1016/J.BMHIMX.2015.09.011>
- Lu, X. B., Liu, Y., & Zhou, H. (2018). Learning nature: Recyclable monomers and polymers. *Chemistry - A European Journal*, 24(44), 11255–11266. <https://doi.org/10.1002/chem.201704461>
- M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition.* (n.d.). Retrieved from www.clsi.org.
- Magaña, H., Palomino, K., Cornejo-Bravo, J. M., Alvarez-Lorenzo, C., Díaz-Gómez, L., Zavala-Lagunes, E., ... Bucio, E. (2016). Polymeric prodrug-functionalized polypropylene films for sustained release of salicylic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 511, pp. 579–585. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.044>
- María Carmen Fariñas, José Daniel García-Palomo, & Manuel Gutiérrez-Cuadra. (2008). *Infecciones asociadas a los catéteres utilizados para la hemodiálisis y la diálisis peritoneal* | *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (8th ed., Vol. 26). Retrieved from <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-infecciones-asociadas-los-cateteres-utilizados-13127459>
- Melendez-Ortiz. (2014). Binary graft modification of polypropylene for anti-inflammatory drug-device combo products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(4), 1269–1277. <https://doi.org/10.1002/JPS.23903>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.

[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Muller, E., Al-Attar, J., Wolff, A. G., & Farber, B. F. (1998). Mechanism of salicylate-mediated inhibition of biofilm in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 501–503. <https://doi.org/10.1086/517386>
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., & Tenover, R. H. (2004). Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition: Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. *Clinical Infectious Diseases*, 38(8). <https://doi.org/10.1086/383067>
- Nageswara Rao, R., & Nagaraju, V. (2003). An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(3), 335–377. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00293-0)
- Nordon, A., McGill, C. A., & Littlejohn, D. (2001, January 1). Process NMR spectrometry. *Analyst*, Vol. 126, pp. 260–272. <https://doi.org/10.1039/b009293m>
- Oliyai, R. (1996, May 22). Prodrugs of peptides and peptidomimetics for improved formulation and delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 19, pp. 275–286. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00110-S](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00110-S)
- Öncül O, Öksüz S, Acar A, Ülkür E, Turhan V, Uygur F, et al. (2014). Nosocomial infection characteristics in a burn intensive care unit: Analysis of an eleven-year active surveillance. *Burns*, 40 (5), 835-41.
- Palazzina, M., & Monteroni, V. (2006). *Synthesis of a Molecularly Imprinted Polymer for Dioxin*. 915–924.
- Palena, M. C., García, M. C., Manzo, R. H., & Jimenez-Kairuz, A. F. (2015). Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.014>

Parker, T., Limer, E., Watson, A. D., Defernez, M., Williamson, D., & Kemsley, E. K. (2014, May 1). 60MHz ¹H NMR spectroscopy for the analysis of edible oils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 57, pp. 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.006>

Pesquera, L., Serrano-Martín, X., Núñez, J., & Chinea, C. (2019). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS DE ÁCIDO POLI-(LÁCTICO-CO-GLICÓLICO). EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES COMO POTENCIAL AGENTE DE LIBERACIÓN CONTROLADA, EN LA QUIMIOTERAPIA CONTRA LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA. In *Rev. Iberoam. Polímeros* (Vol. 20).

Pitzer, K. S. (2002). Electrolyte theory - improvements since Debye and Hueckel. *Accounts of Chemical Research*, 10(10), 371–377. <https://doi.org/10.1021/AR50118A004>

Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. J., & Demple, B. (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the Escherichia coli responses to superoxide stress and sodium salicylate. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3890–3902. <https://doi.org/10.1128/JB.183.13.3890-3902.2001>

Prithiviraj, B., Bais, H. P., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E. H., Dayakar, B. V., ... Vivanco, J. M. (2005). Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicylic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and Caenorhabditis elegans. *Infection and Immunity*, 73(9), 5319–5328. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5319-5328.2005>

Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., & Savolainen, J. (2008). Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 255. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrd2468>

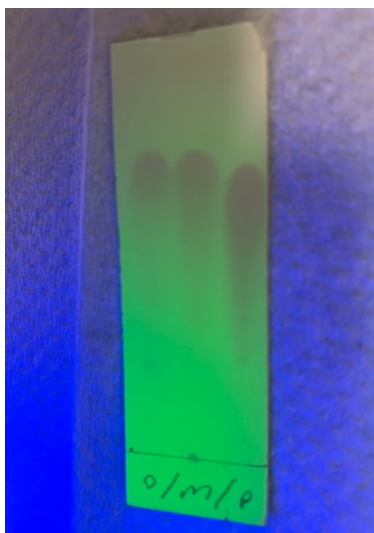
Ravve, A. (2013). *Principles of Polymer Chemistry*. Springer US.

- Repaske, D. R., & Adler, J. (1981). Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellents. *Journal of Bacteriology*, 145(3), 1196–1208. <https://doi.org/10.1128/jb.145.3.1196-1208.1981>
- Riddhiben, P., Piyushbhai, P., & Natubhai, P. (2011). Stability indicating HPLC method development - a review. *International Research Journal of Pharmacy*, 2.
- Sáez V., Hernáez E., S. A. L. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 55–70.
- Sietmann, R., Uebe, R., Böer, E., Bode, R., Kunze, G., & Schauer, F. (2010). Novel metabolic routes during the oxidation of hydroxylated aromatic acids by the yeast *Arxula adenivorans*. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 789–799. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2009.04474.X>
- Simpson, A. (2001). Multidimensional solution state NMR of humic substances: A practical guide and review. *Soil Science*, Vol. 166, pp. 795–809. <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00006>
- Skoog, D. a., West, D. M., Holler, F. J., & Couch, S. R. (2005). Fundamentos de Química Analítica. *Fundamentos de Química Analítica*, (March 2016), 374. <https://doi.org/10.1016/S0584-8547>
- Snyder, S. S., Cao, Y., & Uhrich, K. E. (2019). Extrudable salicylic acid-based poly(anhydride-esters) for injectable drug releasing applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 34(2), 178–189. <https://doi.org/10.1177/0883911519834808>
- Soni, M. G., Carabin, I. G., & Burdock, G. A. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 43(7), 985–1015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020>

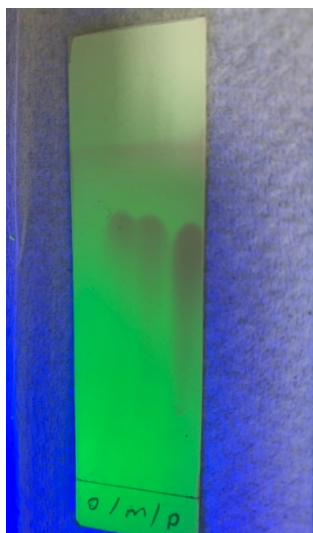
- Su, F. Y., Srinivasan, S., Lee, B., Chen, J., Convertine, A. J., West, T. E., ... Stayton, P. S. (2018). Macrophage-targeted drugamers with enzyme-cleavable linkers deliver high intracellular drug dosing and sustained drug pharmacokinetics against alveolar pulmonary infections. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.014>
- Suñé, J. M., & Bel, E. (2002). Nuevas aportaciones galénicas a las formas galénicas de administración. Formación continuada para farmacéuticos de hospital. In *Fundación Promedic*.
- Teresa de J. Chávez-Velarde, Juan C. Lona-Reyes, A. R.-D. y L. G. O.-A. (2017). *Incidencia y factores de riesgo para bacteriemia en pacientes pediátricos con quemaduras en un Centro de Atención Especializado en México*.
- Tetko, I. V. (2005). Computing chemistry on the web. *Drug Discovery Today*, 10(22), 1497–1500. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03584-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03584-1)
- Vattem, D. A., Lin, Y. T., Ghaedian, R., & Shetty, K. (2005). Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, 40(5), 1583–1592. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.024>
- Vila, J., & Soto, S. M. (2012). Salicylate increases the expression of *marA* and reduces in vitro biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* by decreasing type 1 fimbriae expression. [Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Viru.19205](http://dx.doi.org/10.4161/Viru.19205), 3(3), 280–285. <https://doi.org/10.4161/VIRU.19205>
- Wang, H. Y., Zhang, W. W., Wang, N., Li, C., Li, K., & Yu, X. Q. (2010). Biocatalytic synthesis and in vitro release of biodegradable linear polyesters with pendant ketoprofen. *Biomacromolecules*. <https://doi.org/10.1021/bm100712k>
- Whitaker-Brothers, K., & Uhrich, K. (2006). Investigation into the erosion mechanism of

- salicylate-based poly(anhydride-esters). *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 76(3), 470–479. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30356>
- Young, F. M., Phungtamdet, W., & Sanderson, B. J. S. (2005). Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicology in Vitro*, 19(8), 1051–1059. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.05.001>
- Zimmermann, P., & Curtis, N. (2017). Antimicrobial effects of antipyretics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02268-16>
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 135, 4-Hydroxybenzoic acid. Retrieved May 7, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzoic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 7420, 3-Hydroxybenzoic acid. Retrieved May 7, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Hydroxybenzoic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 338, Salicylic acid. Retrieved May 7, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-acid>.

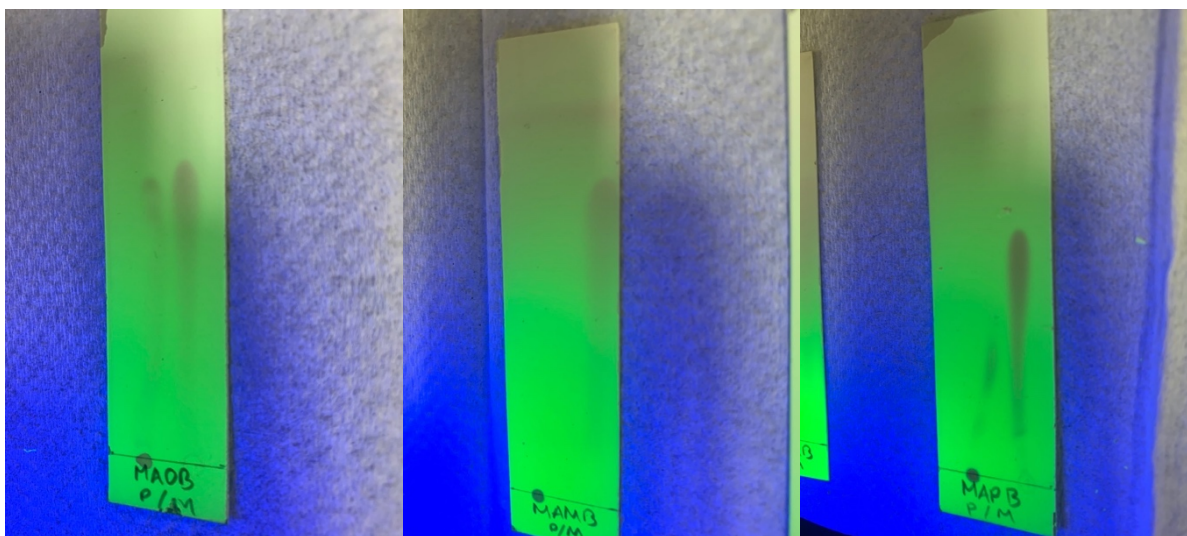
7. Anexos



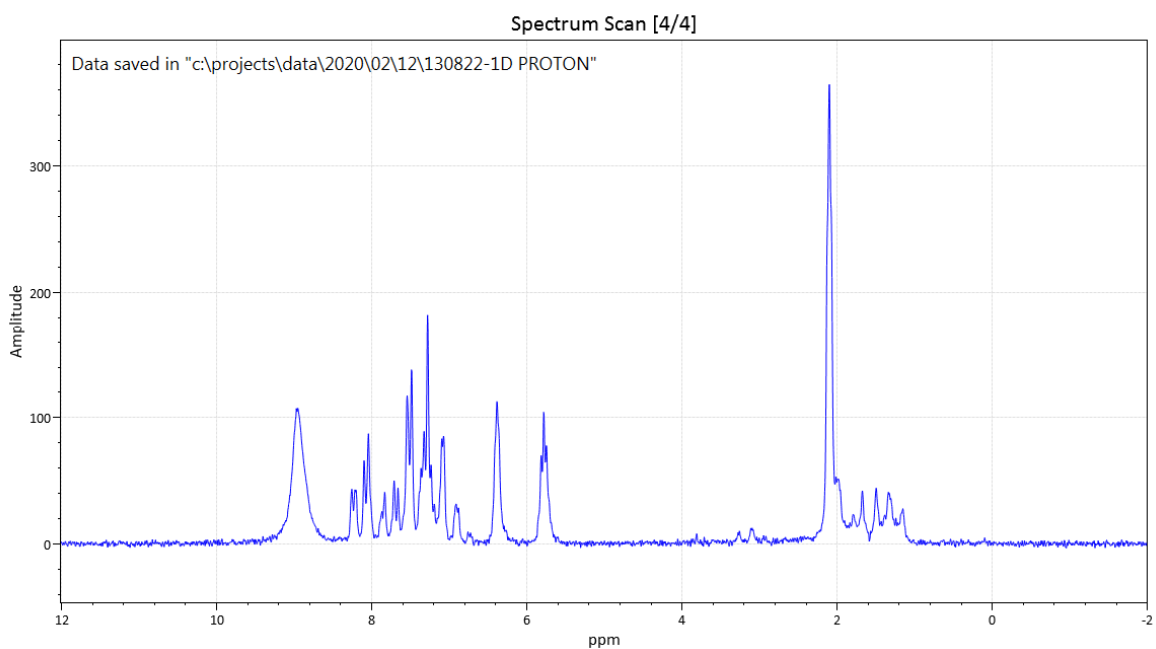
Anexo 1. TLC de los monómeros b) MAOB (o), d) MAMB (m) y f) MAPB (p) antes de ser purificados.



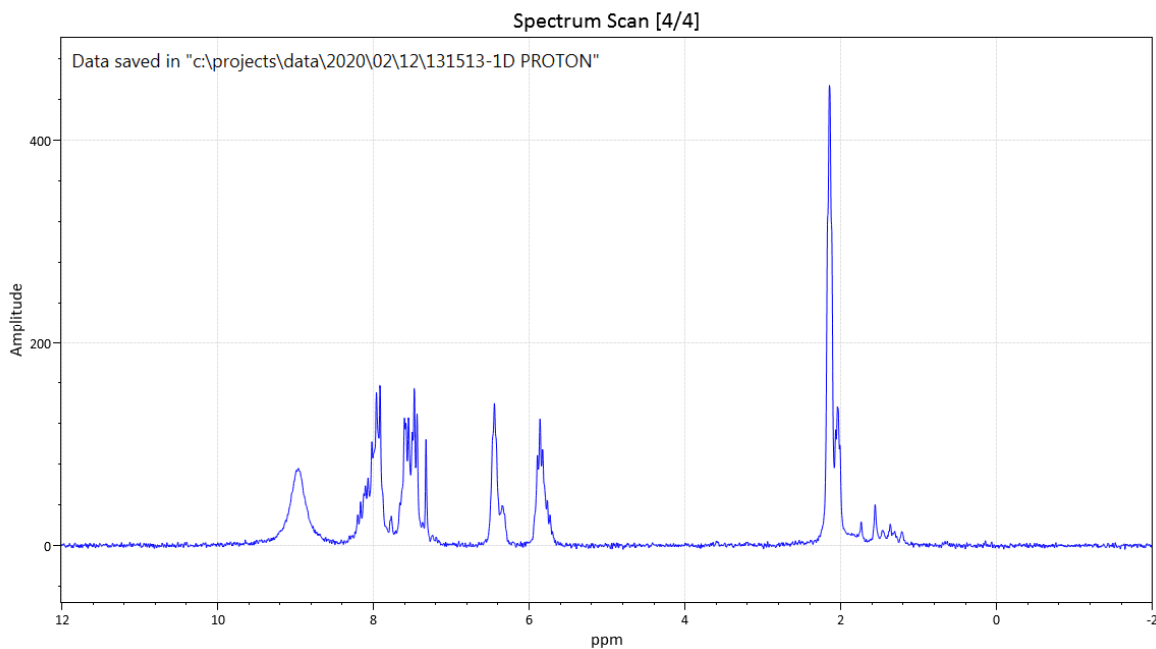
Anexo 2. TLC de los monómeros b) MAOB (o), d) MAMB (m) y f) MAPB (p) después de ser purificados.



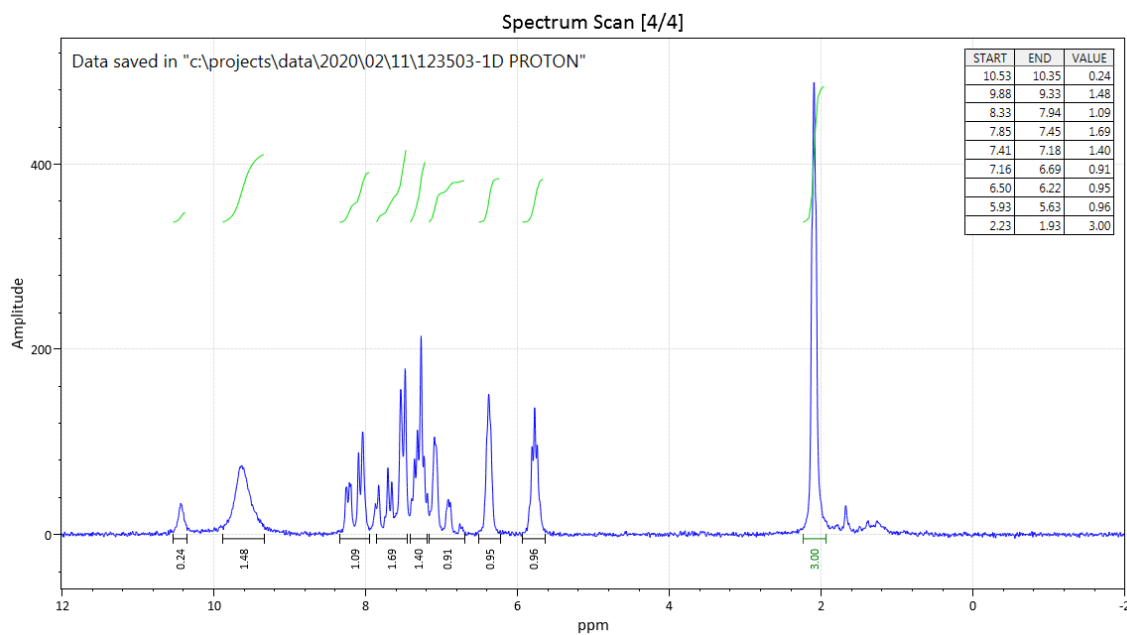
Anexo 3. TLC de los monómeros b) MAOB (izq, M), d) MAMB (centro, M) y f) MAPB purificados y sus respectivos polímeros, g) poli(MAOB) (izq, P), h) poli(MAMB) y i) poli(MAPB) (centro, P) antes de ser purificados.



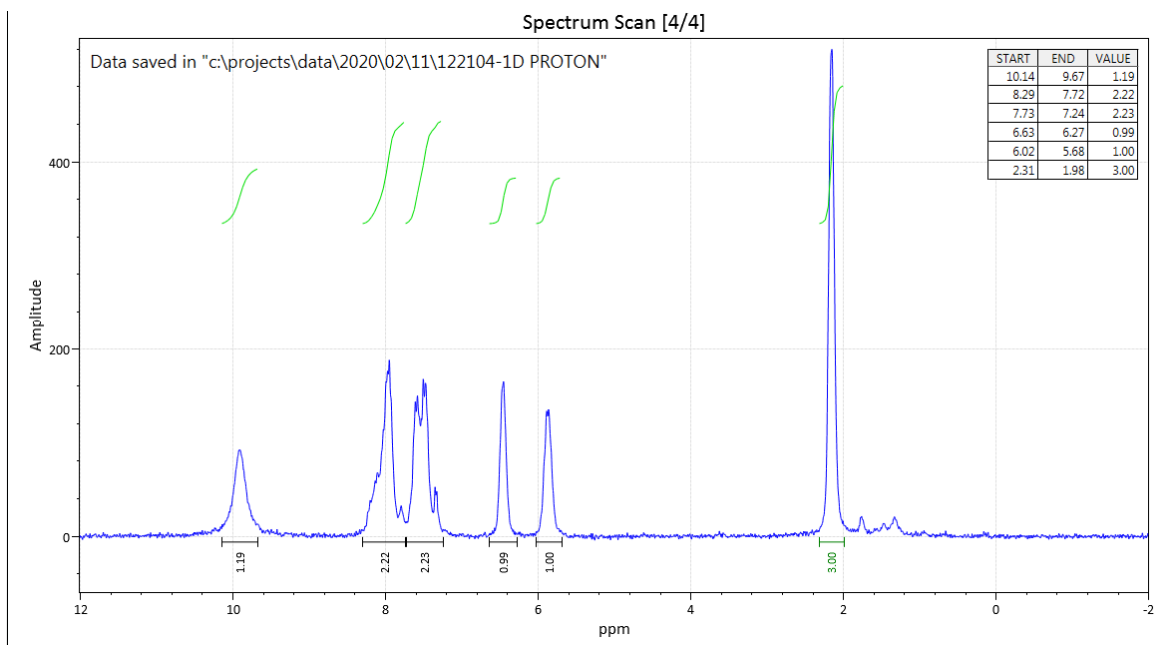
Anexo 3. Espectro de RMN-¹H del MAOB sin purificar, en el cual se detectaron señales entre 2.4-2.8 y entre 1.4-1.9 ppm consideradas como impurezas.



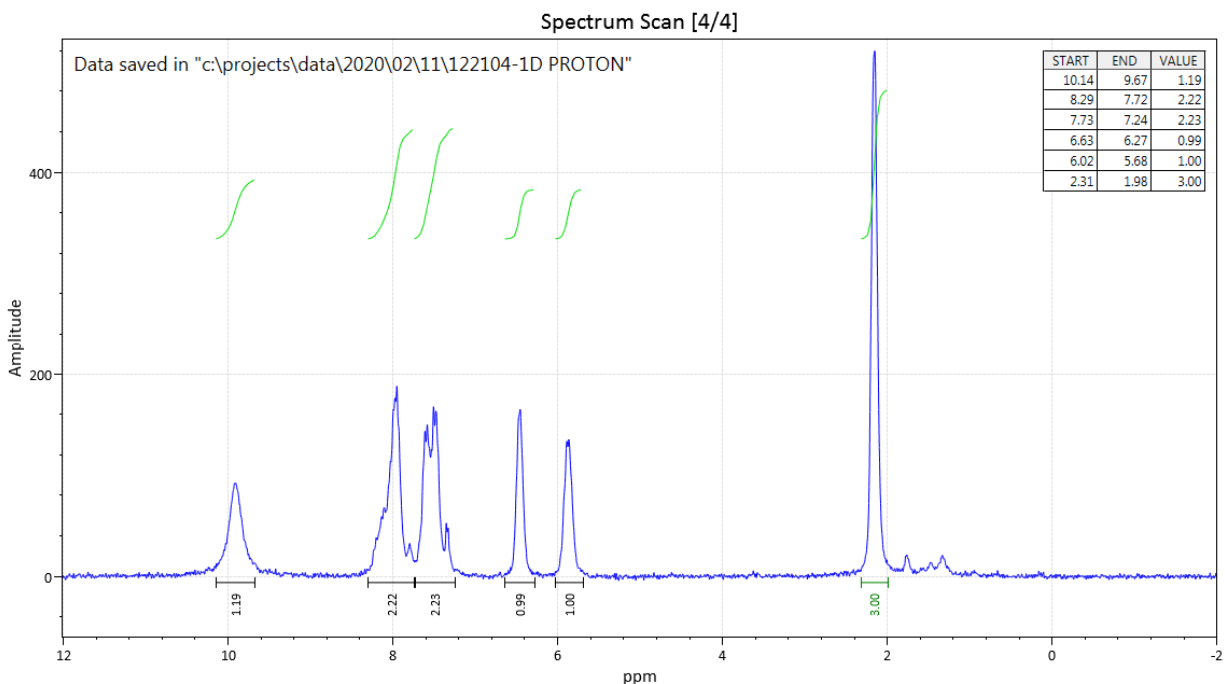
Anexo 4. Espectro de RMN- ^1H del MAMB sin purificar, en el cual se detectaron señales entre 1.6-2 ppm consideradas como impurezas y/o humedad.



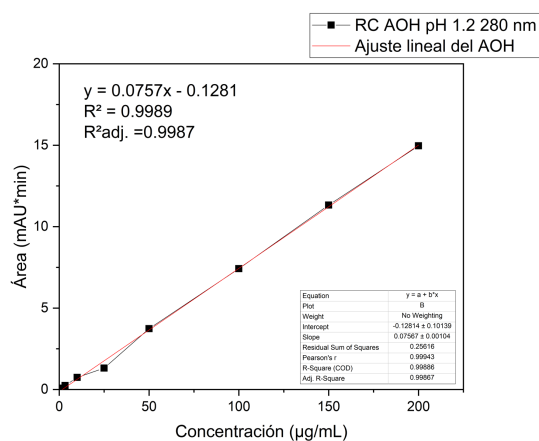
Anexo 5. Espectro de RMN- ^1H del MAOB purificado, se observó la disminución drástica de las señales entre 1.4-1.9 ppm y la desaparición de las señales entre 2.4-2.8 ppm consideradas como impurezas.



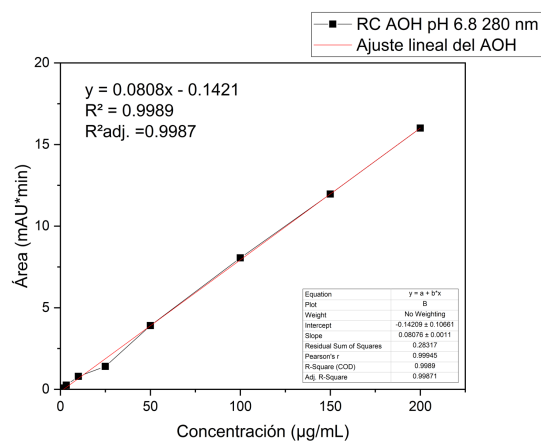
Anexo 6. Espectro de RMN- ^1H del MAMB purificado, se observó la disminución en la intensidad de la señales entre 1.6-2 ppm además de una mayor nitidez en las señales.



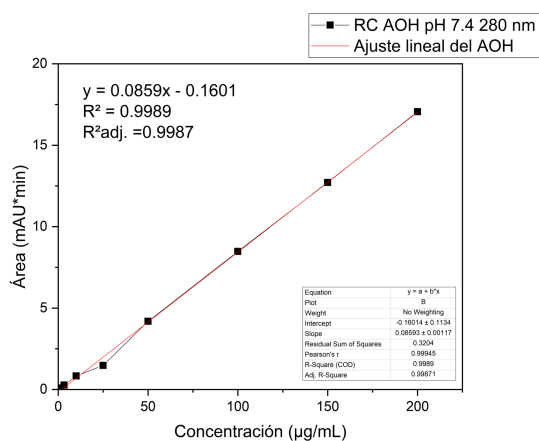
Anexo 7. Espectro de RMN del MAMB en el equipo de RMN Spinsolve high de 60 MHz. (CDCl_3) δ (ppm) 9.91 (s, 1H, $-\text{COOH}$), 7.24-8.29 (m, 4H, protones aromáticos), 6.45 (s, 1H, $=\text{C}=\text{CH}_2$, trans), 5.93 (s, 1H, $=\text{C}=\text{CH}_2$, cis), 2.15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).



Curva de calibración del AOH en buffer pH 1.2

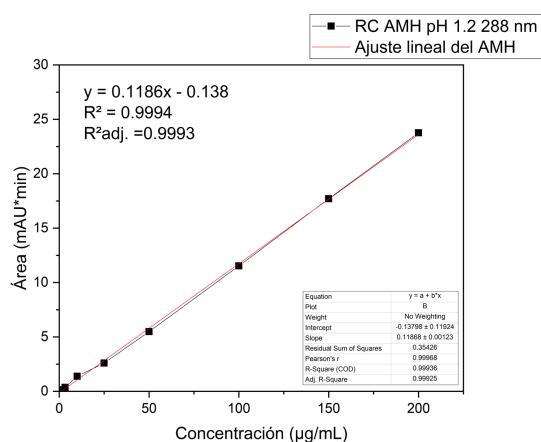


Curva de calibración del AOH en buffer pH 6.8

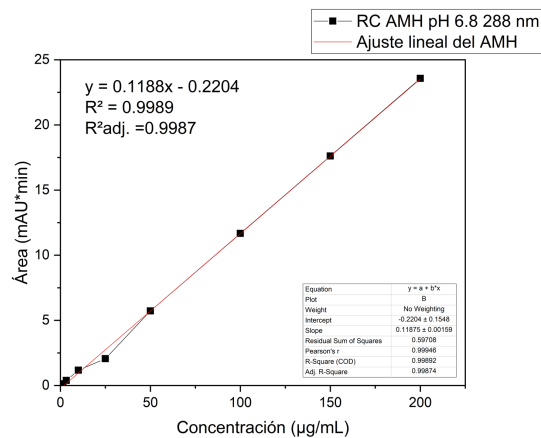


Curva de calibración del AOH en buffer pH 7.4

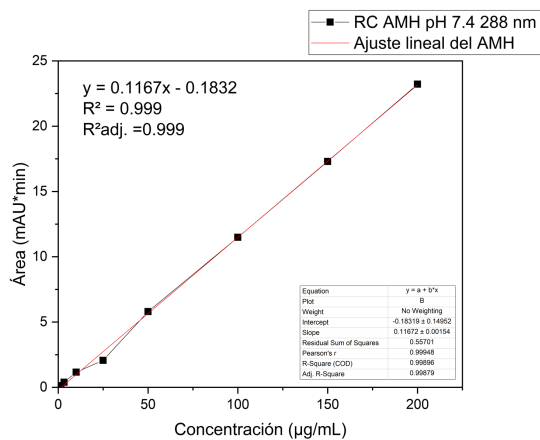
Anexo 4. Curvas de calibración del AOH (ácido *o*-hidroxibenzoico) en pH fisiológicos por CLAR a 280 nm.



Curva de calibración del AMH en buffer pH 1.2

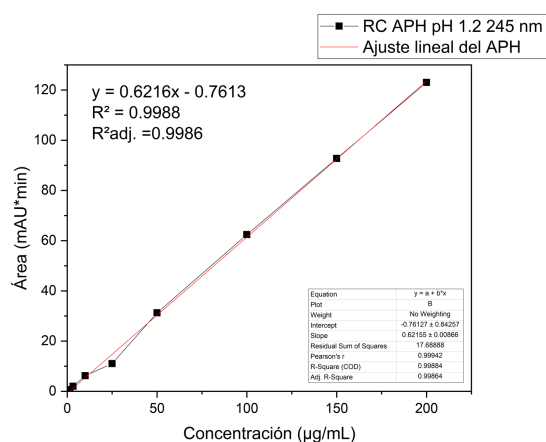


Curva de calibración del AMH en buffer pH 6.8

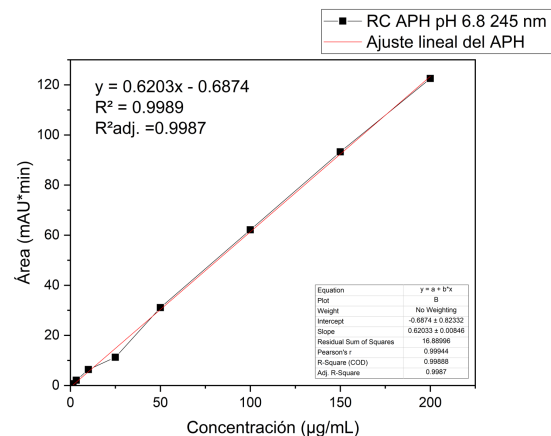


Curva de calibración del AMH en buffer pH 7.4

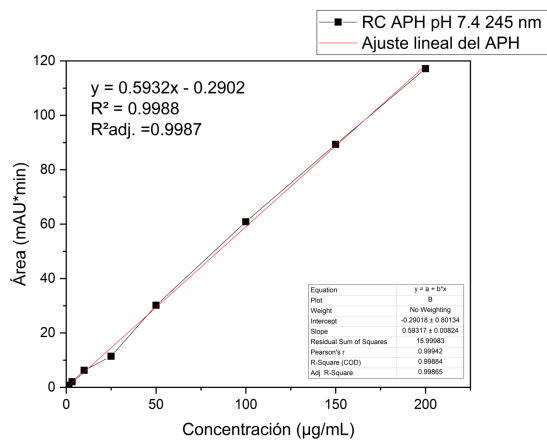
Anexo 5. Curvas de calibración del AMH (ácido *m*-hidroxibenzoico) en pH fisiológicos por CLAR a 288 nm.



Curva de calibración del APH en buffer pH 1.2



Curva de calibración del APH en buffer pH 6.8



Curva de calibración del APH en buffer pH 7.4

Anexo 6. Curvas de calibración del APH (ácido *p*-hidroxibenzoico) en pH fisiológicos por CLAR a 245 nm.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.408267	X
0.25	3	0.543933	X
0.5	3	0.547067	X
0.125	3	0.551967	X
DMSO 1%	3	0.6067	X
0.0625	3	0.609967	X
Control	3	0.683533	X
0.03125	3	0.690033	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5	*	-0.1388	0.041426
1 - 0.25	*	-0.135667	0.041426
1 - 0.125	*	-0.1437	0.041426
1 - 0.0625	*	-0.2017	0.041426
1 - 0.03125	*	-0.281767	0.041426
1 - Control	*	-0.275267	0.041426
1 - DMSO 1%	*	-0.198433	0.041426
0.5 - 0.25		0.00313333	0.041426
0.5 - 0.125		-0.0049	0.041426
0.5 - 0.0625	*	-0.0629	0.041426
0.5 - 0.03125	*	-0.142967	0.041426
0.5 - Control	*	-0.136467	0.041426
0.5 - DMSO 1%	*	-0.0596333	0.041426
0.25 - 0.125		-0.00803333	0.041426
0.25 - 0.0625	*	-0.0660333	0.041426
0.25 - 0.03125	*	-0.1461	0.041426
0.25 - Control	*	-0.1396	0.041426
0.25 - DMSO 1%	*	-0.0627667	0.041426
0.125 - 0.0625	*	-0.058	0.041426
0.125 - 0.03125	*	-0.138067	0.041426
0.125 - Control	*	-0.131567	0.041426
0.125 - DMSO 1%	*	-0.0547333	0.041426
0.0625 - 0.03125	*	-0.0800667	0.041426
0.0625 - Control	*	-0.0735667	0.041426
0.0625 - DMSO 1%		0.00326667	0.041426
0.03125 - Control		0.0065	0.041426
0.03125 - DMSO 1%	*	0.0833333	0.041426
Control - DMSO 1%	*	0.0768333	0.041426
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 7. Pruebas de rango múltiple de poli(MAOb) en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 23 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 4 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.0844333	X
0.5	3	0.482467	X
0.25	3	0.563333	X
0.0625	3	0.581433	XX
0.125	3	0.587833	XX
0.03125	3	0.602467	X
DMSO 1%	3	0.6067	X
Control	3	0.683533	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5	*	-0.398033	0.0367278
1 - 0.25	*	-0.4789	0.0367278
1 - 0.125	*	-0.5034	0.0367278
1 - 0.0625	*	-0.497	0.0367278
1 - 0.03125	*	-0.518033	0.0367278
1 - Control	*	-0.5991	0.0367278
1 - DMSO 1%	*	-0.522267	0.0367278
0.5 - 0.25	*	-0.0808667	0.0367278
0.5 - 0.125	*	-0.105367	0.0367278
0.5 - 0.0625	*	-0.0989667	0.0367278
0.5 - 0.03125	*	-0.12	0.0367278
0.5 - Control	*	-0.201067	0.0367278
0.5 - DMSO 1%	*	-0.124233	0.0367278
0.25 - 0.125		-0.0245	0.0367278
0.25 - 0.0625		-0.0181	0.0367278
0.25 - 0.03125	*	-0.0391333	0.0367278
0.25 - Control	*	-0.1202	0.0367278
0.25 - DMSO 1%	*	-0.0433667	0.0367278
0.125 - 0.0625		0.0064	0.0367278
0.125 - 0.03125		-0.0146333	0.0367278
0.125 - Control	*	-0.0957	0.0367278
0.125 - DMSO 1%		-0.0188667	0.0367278
0.0625 - 0.03125		-0.0210333	0.0367278
0.0625 - Control	*	-0.1021	0.0367278
0.0625 - DMSO 1%		-0.0252667	0.0367278
0.03125 - Control	*	-0.0810667	0.0367278
0.03125 - DMSO 1%		-0.00423333	0.0367278
Control - DMSO 1%	*	0.0768333	0.0367278
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 8. Pruebas de rango múltiple de poli(MAMB) en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 20 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 5 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente

significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.381833	X
0.5	3	0.558	X
0.125	3	0.588433	XX
0.0625	3	0.6064	XX
DMSO 1%	3	0.6067	XX
0.03125	3	0.6234	X
0.25	3	0.6251	X
Control	3	0.683533	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5	*	-0.176167	0.0527357
1 - 0.25	*	-0.243267	0.0527357
1 - 0.125	*	-0.2066	0.0527357
1 - 0.0625	*	-0.224567	0.0527357
1 - 0.03125	*	-0.241567	0.0527357
1 - Control	*	-0.3017	0.0527357
1 - DMSO 1%	*	-0.224867	0.0527357
0.5 - 0.25	*	-0.0671	0.0527357
0.5 - 0.125		-0.0304333	0.0527357
0.5 - 0.0625		-0.0484	0.0527357
0.5 - 0.03125	*	-0.0654	0.0527357
0.5 - Control	*	-0.125533	0.0527357
0.5 - DMSO 1%		-0.0487	0.0527357
0.25 - 0.125		0.0366667	0.0527357
0.25 - 0.0625		0.0187	0.0527357
0.25 - 0.03125		0.0017	0.0527357
0.25 - Control	*	-0.0584333	0.0527357
0.25 - DMSO 1%		0.0184	0.0527357
0.125 - 0.0625		-0.0179667	0.0527357
0.125 - 0.03125		-0.0349667	0.0527357
0.125 - Control	*	-0.0951	0.0527357
0.125 - DMSO 1%		-0.0182667	0.0527357
0.0625 - 0.03125		-0.017	0.0527357
0.0625 - Control	*	-0.0771333	0.0527357
0.0625 - DMSO 1%		-0.0003	0.0527357
0.03125 - Control	*	-0.0601333	0.0527357
0.03125 - DMSO 1%		0.0167	0.0527357
Control - DMSO 1%	*	0.0768333	0.0527357
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 9. Pruebas de rango múltiple de poli(MAPB) en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha

colocado un asterisco junto a 15 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 4 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.253467	X
0.5	3	0.326233	X
0.25	3	0.412167	X
0.125	3	0.419867	X
DMSO 1%	3	0.420133	X
0.03125	3	0.464467	X
Control	3	0.4657	X
0.0625	3	0.4708	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5	*	-0.0727667	0.0604618
1 - 0.25	*	-0.1587	0.0604618
1 - 0.125	*	-0.1664	0.0604618
1 - 0.0625	*	-0.217333	0.0604618
1 - 0.03125	*	-0.211	0.0604618
1 - Control	*	-0.212233	0.0604618
1 - DMSO 1%	*	-0.166667	0.0604618
0.5 - 0.25	*	-0.0859333	0.0604618
0.5 - 0.125	*	-0.0936333	0.0604618
0.5 - 0.0625	*	-0.144567	0.0604618
0.5 - 0.03125	*	-0.138233	0.0604618
0.5 - Control	*	-0.139467	0.0604618
0.5 - DMSO 1%	*	-0.0939	0.0604618
0.25 - 0.125		-0.0077	0.0604618
0.25 - 0.0625		-0.0586333	0.0604618
0.25 - 0.03125		-0.0523	0.0604618
0.25 - Control		-0.0535333	0.0604618
0.25 - DMSO 1%		-0.00796667	0.0604618
0.125 - 0.0625		-0.0509333	0.0604618
0.125 - 0.03125		-0.0446	0.0604618
0.125 - Control		-0.0458333	0.0604618
0.125 - DMSO 1%		-0.000266667	0.0604618
0.0625 - 0.03125		0.00633333	0.0604618
0.0625 - Control		0.0051	0.0604618
0.0625 - DMSO 1%		0.0506667	0.0604618
0.03125 - Control		-0.00123333	0.0604618
0.03125 - DMSO 1%		0.0443333	0.0604618
Control - DMSO 1%		0.0455667	0.0604618
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 10. Pruebas de rango múltiple de MAOB en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 13 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 3 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.0796667	X
0.5	3	0.113	XX
0.25	3	0.149667	X
0.125	3	0.341567	X
0.0625	3	0.342733	X
DMSO 1%	3	0.420133	X
0.03125	3	0.445767	XX
Control	3	0.4657	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5		-0.0333333	0.040735
1 - 0.25	*	-0.07	0.040735
1 - 0.125	*	-0.2619	0.040735
1 - 0.0625	*	-0.263067	0.040735
1 - 0.03125	*	-0.3661	0.040735
1 - Control	*	-0.386033	0.040735
1 - DMSO 1%	*	-0.340467	0.040735
0.5 - 0.25		-0.0366667	0.040735
0.5 - 0.125	*	-0.228567	0.040735
0.5 - 0.0625	*	-0.229733	0.040735
0.5 - 0.03125	*	-0.332767	0.040735
0.5 - Control	*	-0.3527	0.040735
0.5 - DMSO 1%	*	-0.307133	0.040735
0.25 - 0.125	*	-0.1919	0.040735
0.25 - 0.0625	*	-0.193067	0.040735
0.25 - 0.03125	*	-0.2961	0.040735
0.25 - Control	*	-0.316033	0.040735
0.25 - DMSO 1%	*	-0.270467	0.040735
0.125 - 0.0625		-0.00116667	0.040735
0.125 - 0.03125	*	-0.1042	0.040735
0.125 - Control	*	-0.124133	0.040735
0.125 - DMSO 1%	*	-0.0785667	0.040735
0.0625 - 0.03125	*	-0.103033	0.040735
0.0625 - Control	*	-0.122967	0.040735
0.0625 - DMSO 1%	*	-0.0774	0.040735

0.03125 - Control		-0.0199333	0.040735
0.03125 - DMSO 1%		0.0256333	0.040735
Control - DMSO 1%	*	0.0455667	0.040735
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 11. Pruebas de rango múltiple de MAMB en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 23 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 5 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.0821667	X
0.5	3	0.107433	X
0.25	3	0.157267	X
0.125	3	0.3038	X
0.0625	3	0.3358	X
0.03125	3	0.404467	X
DMSO 1%	3	0.420133	X
Control	3	0.4657	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5		-0.0252667	0.0317933
1 - 0.25	*	-0.0751	0.0317933
1 - 0.125	*	-0.221633	0.0317933
1 - 0.0625	*	-0.253633	0.0317933
1 - 0.03125	*	-0.3223	0.0317933
1 - Control	*	-0.383533	0.0317933
1 - DMSO 1%	*	-0.337967	0.0317933
0.5 - 0.25	*	-0.0498333	0.0317933
0.5 - 0.125	*	-0.196367	0.0317933
0.5 - 0.0625	*	-0.228367	0.0317933
0.5 - 0.03125	*	-0.297033	0.0317933
0.5 - Control	*	-0.358267	0.0317933
0.5 - DMSO 1%	*	-0.3127	0.0317933
0.25 - 0.125	*	-0.146533	0.0317933
0.25 - 0.0625	*	-0.178533	0.0317933
0.25 - 0.03125	*	-0.2472	0.0317933
0.25 - Control	*	-0.308433	0.0317933
0.25 - DMSO 1%	*	-0.262867	0.0317933
0.125 - 0.0625	*	-0.032	0.0317933
0.125 - 0.03125	*	-0.100667	0.0317933
0.125 - Control	*	-0.1619	0.0317933

0.125 - DMSO 1%	*	-0.116333	0.0317933
0.0625 - 0.03125	*	-0.0686667	0.0317933
0.0625 - Control	*	-0.1299	0.0317933
0.0625 - DMSO 1%	*	-0.0843333	0.0317933
0.03125 - Control	*	-0.0612333	0.0317933
0.03125 - DMSO 1%		-0.0156667	0.0317933
Control - DMSO 1%	*	0.0455667	0.0317933
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 12. Pruebas de rango múltiple de MAPB en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 26 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 6 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.3489	X
0.5	3	0.395433	X
DMSO 1%	3	0.4231	XX
0.25	3	0.4562	XX
0.125	3	0.474367	X
Control	3	0.5205	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5	*	-0.0465333	0.046129
1 - 0.25	*	-0.1073	0.046129
1 - 0.125	*	-0.125467	0.046129
1 - Control	*	-0.1716	0.046129
1 - DMSO 1%	*	-0.0742	0.046129
0.5 - 0.25	*	-0.0607667	0.046129
0.5 - 0.125	*	-0.0789333	0.046129
0.5 - Control	*	-0.125067	0.046129
0.5 - DMSO 1%		-0.0276667	0.046129
0.25 - 0.125		-0.0181667	0.046129
0.25 - Control	*	-0.0643	0.046129
0.25 - DMSO 1%		0.0331	0.046129
0.125 - Control	*	-0.0461333	0.046129
0.125 - DMSO 1%	*	0.0512667	0.046129
Control - DMSO 1%	*	0.0974	0.046129
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 13. Pruebas de rango múltiple de AOB en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La

mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 12 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 5 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			
	Recuento	Media	Grupos homogéneos
1	3	0.413233	X
DMSO 1%	3	0.4231	X
0.5	3	0.4447	X
0.125	3	0.463533	XX
0.25	3	0.4647	XX
Control	3	0.5205	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5		-0.0314667	0.0621735
1 - 0.25		-0.0514667	0.0621735
1 - 0.125		-0.0503	0.0621735
1 - Control	*	-0.107267	0.0621735
1 - DMSO 1%		-0.00986667	0.0621735
0.5 - 0.25		-0.02	0.0621735
0.5 - 0.125		-0.0188333	0.0621735
0.5 - Control	*	-0.0758	0.0621735
0.5 - DMSO 1%		0.0216	0.0621735
0.25 - 0.125		0.00116667	0.0621735
0.25 - Control		-0.0558	0.0621735
0.25 - DMSO 1%		0.0416	0.0621735
0.125 - Control		-0.0569667	0.0621735
0.125 - DMSO 1%		0.0404333	0.0621735
Control - DMSO 1%	*	0.0974	0.0621735
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 14. Pruebas de rango múltiple de AMB en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 3 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.

Pruebas de rango múltiple			
Método: 95,0 por ciento Bonferroni			

	Recuento	Media	Grupos homogéneos
DMSO 1%	3	0.4231	X
1	3	0.436467	XX
0.5	3	0.4595	X
0.25	3	0.463567	XX
0.125	3	0.497467	XX
Control	3	0.5205	X
Contraste	Sig.	Diferencia	#ERROR!
1 - 0.5		-0.0230333	0.0347768
1 - 0.25		-0.0271	0.0347768
1 - 0.125	*	-0.061	0.0347768
1 - Control	*	-0.0840333	0.0347768
1 - DMSO 1%		0.0133667	0.0347768
0.5 - 0.25		-0.00406667	0.0347768
0.5 - 0.125	*	-0.0379667	0.0347768
0.5 - Control	*	-0.061	0.0347768
0.5 - DMSO 1%	*	0.0364	0.0347768
0.25 - 0.125		-0.0339	0.0347768
0.25 - Control	*	-0.0569333	0.0347768
0.25 - DMSO 1%	*	0.0404667	0.0347768
0.125 - Control		-0.0230333	0.0347768
0.125 - DMSO 1%	*	0.0743667	0.0347768
Control - DMSO 1%	*	0.0974	0.0347768
* denota una diferencia estadísticamente significativa.			

Anexo 15. Pruebas de rango múltiple de APB en prueba de MTT. Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las demás. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 9 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 4 grupos homogéneos mediante columnas de X. Dentro de cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no existen diferencias estadísticamente significativas. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Con este método, existe un riesgo de 5.0% de llamar a uno o más pares significativamente diferentes cuando su diferencia real es igual a 0.