



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“Síntesis de nanogeles pegilados sensibles al pH  
para el cargado y la liberación de curcumina y 5-  
fluoruracilo”**

**TRABAJO DE TESIS**

Presentado por

**QFB. Bibiana Roselly Cota Ramírez**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**

Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Co-Director de tesis

Dra. Aracely Serrano Medina

**TIJUANA, B.C. AGOSTO DEL 2022**

## HOJA DE APROBACIÓN

### Universidad Autónoma de Baja California FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.328  
Tijuana, B.C., a 16 de Junio del 2022

C. Bibiana Roselly Cota Ramirez  
Pasante de Maestro en Ciencias  
Presente


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

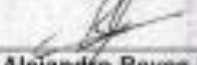
Es propuesto, por las C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo y  
Dra. Aracely Serrano Medina

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente  
referido al tema "Síntesis de nanogeles pegilados sensibles al pH Para el  
cargado y la liberación de curcumina y 5-fluorouracilo"

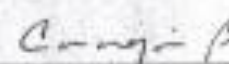
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:


- I. HOJA DE APROBACIÓN
- II. DEDICATORIA
- III. AGRADECIMIENTOS
- IV. INDICE O CONTENIDO
- V. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
- VI. LISTA DE TABLAS
- VII. LISTA DE FIGURAS
- VIII. VITA Y ÁREA DE ESTUDIO
- IX. RESUMEN

  
Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez  
Sub-Directora

  
M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez  
Director



  
Dr. José Manuel Cornejo Bravo  
Director de Tesis

  
Dra. Aracely Serrano Medina  
Co-Directora de Tesis

## **DEDICATORA**

**Dedico este trabajo a mis padres y a mi esposo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Dra. Aracely Serrano Medina, por haberme guiado y aceptado en su equipo de trabajo y darme la oportunidad de realizar un posgrado, por sus enseñanzas, apoyo, consejos, profesionalismo, amistad, y confianza como su alumna.**

**Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Biofarmacia , por su confianza, sus enseñanzas y sus consejos para el desarrollo del proyecto.**

**A las maestras Jocelyn Marcela Alcalá Zacarías y Mayte Nuño Rodríguez por compartir su conocimiento conmigo.**

**A todos mis compañeros del laboratorio especialmente Michelle, Alma, Efraín, Alondra, Yuritzzy, Katy y Daniel por su tiempo, amistad y disposición para orientarme en el correcto uso de los equipos de laboratorio y programas computacionales, por haber convivido siempre cordialmente y con respeto.**

**A mi familia por apoyarme siempre incondicionalmente en todo lo que he decidido hacer alentándome a seguir adelante.**

**A CONACYT por la beca otorgada durante los estudios de maestría.**

## **RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradeciendo a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, reconociendo al laboratorio de biofarmacia, donde se desarrolló el presente proyecto de investigación bajo la dirección del Dr. José Manuel Cornejo Bravo y la Dra. Aracely Serrano Medina, en el programa de Maestría y doctorado en ciencias de la salud. Gracias al Centro de graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana por la colaboración del Dr, Ignacio Alfredo Rivero Espejel en la etapa de caracterización. A todo el personal académico y administrativo de la Universidad Autónoma de Baja California. Finalmente agradezco el apoyo obtenido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de estudios de posgrado y el desarrollo de esta investigación a través de una beca con número 902973.

## ÍNDICE

<b>Hoja de aprobación</b> .....	I
<b>Dedicatoria</b> .....	II
<b>Agradecimientos</b> .....	III
<b>ÍNDICE o CONTENIDO</b> .....	IV
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	V
<b>Lista de Tablas</b> .....	VI
<b>Lista de Figuras</b> .....	VII
<b>Vita y área de estudio</b> .....	VIII
<b>Resumen</b> .....	IX
<b>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN</b> .....	16
Antecedentes.....	19
Justificación .....	23
Hipótesis .....	24
Objetivos.....	24
Objetivo Generales.....	24
Objetivos Específicos.....	25
<b>CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL</b> .....	26
Generalidades de cáncer de colon.....	27
Tratamientos para el cáncer de colon.....	27
Curcumina.....	30
Polimerización en emulsión sin detergente.....	33
<b>CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	34
III.1. Materiales y reactivos.....	35
III.1.2. Equipos.....	36
III.2 Métodos.....	37
III.2.1 Purificación de etilenglicol dimetacrilato.....	37
III.2.2 Síntesis de nanogeles mediante el método de polimerización en emulsión sin detergente.....	37
III.2.3 Caracterización de los nanogeles.....	39

III.2.3.1. Diámetro hidrodinámico.....	39
III.2.3.2. Potencial zeta.....	39
III.2.3.3. Imágenes FESEM.....	39
III.2.4 Liofilización y reconstitución de los nanogeles.....	39
III.2.4.1. Liofilización.....	40
III.2.4.2. Reconstitución.....	40
III.2.5 Degradación de nanogeles de CAM10-BAAC (hidrólisis de nanogeles).....	40
III.2.6. Cargado de los nanogeles con 5-FU.....	41
III.2.7. Cargado de los nanogeles con curcumina.....	42
III.2.8. Cinética de liberación in vitro de CUR.....	42
III.2.9. Cinética de liberación in vitro de 5-FU.....	43
III.2.10. Ensayo de viabilidad de los nanogeles cargados con CUR y 5-FU.....	44
<b>CAPITULO IV RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
IV.1. Síntesis y caracterización de los nanogeles sintetizados.....	48
IV.1.1. Síntesis de nanogeles.....	48
IV.1.2. Diámetro hidrodinámico y potencial zeta.....	49
IV.2. Microscopia FESEM.....	51
IV.3. Capacidad carga y Eficiencia de carga de fármacos.....	52
IV.4. Hidrólisis de nanogeles a diferentes pH.....	53
IV.4.1. Hidrólisis de nanogeles a pH 7.4.....	53
IV.4.2. Hidrólisis de nanogeles a pH 6.8.....	55
IV.4.3. Hidrólisis de nanogeles a pH 1.2.....	57
IV.5. Liberaciones de fármacos a diferentes pH.....	60
IV.5.1. Resultados de liberaciones de CUR.....	61
IV.5.2. Resultados de liberaciones de 5-FU.....	64
IV.6. Estudio de citotoxicidad en fibroblastos de los nanogeles cargados por el método de MTT.....	66
<b>CAPITULO V CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>

<b>CAPITULO VI REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>
-------------------------------------	-----------

## **ANEXOS**

ANEXO 1. Cálculos para síntesis de nanogeles por el método de polimerización en emulsión.....	102
ANEXO 2. Curva de calibración para el cargado de curcumina con etanol por UV-VIS.....	106
ANEXO 3. Curva de calibración para el cargado de 5-fluorouracilo con etanol por UV-VIS.....	107
ANEXO 4. Capacidad de carga y eficiencia de carga para nanopartículas cargadas con CUR.....	108
ANEXO 5. Capacidad de carga y eficiencia de carga para nanopartículas cargadas con 5-FU.....	110
ANEXO 6. Curvas de Calibración para liberación de curcumina.....	111
ANEXO 7. Curvas de Calibración para liberación de 5-FU.....	114
ANEXO 8. Fracciones liberadas de 5-FU a diferentes pH.....	117
ANEXO 9. Fracciones liberadas de 5-FU-EGDMA a diferentes pH.....	118
ANEXO 10. Fracciones liberadas de 5-FU-BAAC a diferentes pH.....	119
ANEXO 11. Fracciones liberadas de CUR a diferentes pH.....	120
ANEXO 12. Fracciones liberadas de CUR-BAAC a diferentes pH.....	121
ANEXO 13. Fracciones liberadas de CUR-EGDMA a diferentes pH.....	122

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
%p/v	Porcentaje peso/volumen
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
5-FU	5-fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APS	Persulfato de amonio
CAM10	Ácido 11-metacriloilamido undecanóico
DDS	Sistemas de administración de fármacos
DE	Desviación estándar
Dh	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica
BAAC	N,N'-Bis(acryloyl)cystamine
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
GSH	Glutación (reducido)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
MTT	Bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NGs	Nanogeles
NPs	Nanopartículas

O/W	Aceite en agua
O/W/O	Aceite en agua en aceite
PCAM10	Poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico)
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PEGMAM	Poli(etilenglicol) metacrilato de éter metilo
pH	Potencial de hidrógeno
TGI	Tracto gastrointestinal

## LISTA DE TABLAS

	Pagina
<b>Tabla 1.</b> Reactivos utilizados para la síntesis de los nanogeles y sus cantidades reacción 1.	38
<b>Tabla 2.</b> Reactivos utilizados para la síntesis de los nanogeles y sus cantidades Reacción 2.	38
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de glutatión	41
<b>Tabla 4.</b> Índice de polidispersidad (PDI) y Diámetro hidrodinámico (Dh) de los nanonegeles sintetizados.	48
<b>Tabla 5.</b> Nano partículas de CAM10-PEGMAM-BAAC a diferentes pH.	49
<b>Tabla 6.</b> Nano partículas de CAM10-PEGMAM-EGDMA a diferentes pH.	50
<b>Tabla 7.</b> Nano partículas liofilizadas y reconstituidas.	50
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la Capacidad Carga y Eficiencia de Carga de CUR.	52
<b>Tabla 9.</b> Resultados de Capacidad carga y Eficiencia de carga de 5-FU.	53
<b>Tabla 10.</b> Resultados de Hidrolisis de nanogeles a pH 7.4.	54
<b>Tabla 11.</b> Resultados de Hidrolisis de nanogeles a pH 6.8.	55
<b>Tabla 12.</b> Resultados de Hidrolisis de nanogeles a pH 1.2.	58

## LISTA DE FIGURAS

	Pagina
<b>Figura 1.</b> Nanogeles distribución en agua.	49
<b>Figura 2.</b> Figura 2: Imágenes de microscopia FESEM.	52
<b>Figura 3.</b> Hidrólisis de nanogeles a pH 7.4	55
<b>Figura 4.</b> Hidrólisis de nanogeles a pH 6.8.	57
<b>Figura 5.</b> Hidrólisis de nanogeles a pH 1.2.	59
<b>Figura 6.</b> Cinética de liberación de CUR a diferentes pH durante 120 horas a 37°C.	61
<b>Figura 7.</b> Cinética de liberación de CUR-BAAC a diferentes pH a partir de nanogeles reticulados con BAAC y cargados con CUR.	62
<b>Figura 8.</b> Cinética de liberación de CUR-EGDMA a diferentes pH a partir de los nanogeles reticulados con EGDMA y cargados con CUR.	63
<b>Figura 9.</b> Cinética de liberación de 5-FU en diferentes pH a 37° C.	64
<b>Figura 10.</b> Cinética de liberación de 5-FU-BAAC a diferentes pH a partir de los nanogeles cargados a 37°C.	65
<b>Figura 11.</b> Cinética de liberación de 5-FU-EGDMA a diferentes pH a partir de los nanogeles cargados a 37°C.	66
<b>Figura 12.</b> Imágenes de células tratadas con nanogeles cargados con CUR y 5-FU por el método de MTT obtenidas de FLoid™ Cell Imaging Station.	67
<b>Figura 13.</b> Viabilidad celular de nanogeles CUR y EGDMA.	68
<b>Figura 14.</b> Viabilidad celular de 5-FU.	69
<b>Figura 15.</b> Viabilidad celular de CUR.	70
<b>Figura 16.</b> Viabilidad celular de las formulaciones cargadas con 5-FU.	71
<b>Figura 17.</b> Viabilidad celular de las formulaciones cargadas con CUR.	72
<b>Figura 18.</b> Viabilidad celular de las formulaciones de BAAC.	73
<b>Figura 19.</b> Viabilidad celular de las formulaciones de EGDMA.	74
<b>Figura 20.</b> Viabilidad celular de los diferentes grupos a 400 µg/ ml.	75

## VITA Y ÁREA DE ESTUDIO

Bibiana Roselly Cota Ramírez ; [bibiana.cota@uabc.edu.mx](mailto:bibiana.cota@uabc.edu.mx)

Estudiante de Maestría en Ciencias en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC campus Tijuana, Q.F.B. Egresada de U.A.B.C. Campus Tijuana. Título obtenido mediante tesis con el título de “Mejoras cognitivas en un modelo animal con 4-((Z)- benzilideno)-2-((E)-stiril) oxazol-5(4H)-ona como un fármaco anticolinesterasa”. Un artículo publicado, Cognitive improvements in a rat model with polyunsaturated fatty acids EPA and DHA through  $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptors. Nutr Neurosci. 2020 Aug 25;1-10. doi: 10.1080/1028415X.2020.1809878.

## RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera forma de cáncer más prevalente, después del cáncer de pulmón y cáncer de mama, con la segunda mayor incidencia de muerte. El fármaco quimioterapéutico de primera línea para tratar este cáncer es el 5-fluorouracilo (5-FU), un análogo sintético de pirimidina fluorada administrado por vía intravenosa, que, debido a su alta potencia, también se utiliza para otros tipos de cánceres además de cáncer de colon, como el de mama e hígado. Por otro lado, la curcumina (CUR), un componente activo de la cúrcuma, se ha asociado con varios beneficios para la salud. Sin embargo, sus aplicaciones clínicas están muy limitadas debido a que los dos componentes tienen baja solubilidad en agua, mala absorción oral y metabolismo rápido. Estos problemas han llevado al desarrollo de nano formulaciones para superar las limitaciones de los compuestos. Los sistemas de administración nanométricos se han utilizado ampliamente para mejorar la administración de fármacos poco solubles en agua. Una formulación ideal debería mostrar una mayor actividad anticancerígena en comparación con la curcumina y el 5-FU libres. En este proyecto el objetivo es caracterizar los nanogeles sensibles al pH, así como evaluar la liberación de 5-fluorouracilo (5-FU) y curcumina en condiciones in vitro simulando las diferentes condiciones de pH del tracto gastrointestinal. Para esto se realizaron dos formulaciones para sintetizar nanogeles mediante el método de polimerización en emulsión sin detergente utilizando polietilenglicol metil éter metacrilato (PEGMAM) como estabilizante, el monómero ácido 11-metacriloilamido undecanóico (CAM10) y dos reticulantes, dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) para la primera formulación y N, N'-bis(acriloil) cistamina

(BAAC) para la segunda. Posteriormente, se purificaron y caracterizaron. Dentro de los resultados se encontró que los nanogeles presentaban un tamaño promedio de  $152 \pm 196.9$  nm, una carga superficial de  $-9.94 \pm -12.5$  a pH básicos; también se realizó un estudio de citotoxicidad en fibroblastos dando como resultado una citotoxicidad reducida para los nanogeles cargados con 5-fu y nula para los nanogeles cargados con curcumina, se presentaran resultados de la cinética de liberación a diferentes valores de pH.

## **CAPITULO I. INTRODUCCIÓN**

El cáncer de colón (CC) representa la tercera neoplasia maligna más prevalente en todo el mundo, después de cáncer de pulmón y cáncer de mama, con la segunda mayor incidencia de muerte, después de cáncer de pulmón (Flores 2020). Dentro de sus modalidades de tratamiento, la cirugía se considera la más importante y la única opción curativa para un cáncer localizado pero, para estados avanzados, la administración sistémica de quimioterapia es el enfoque terapéutico más común (Vodenkova et al., 2020; Yuan et al., 2018), por lo que es de suma importancia el desarrollo de nuevas opciones para su prevención y tratamiento. La molécula más importante que se utiliza actualmente para el cáncer de colon como tratamiento quimioterapéutico es el 5-FU, un análogo sintético de pirimidina fluorada administrado por vía intravenosa (IV) debido a su baja biodisponibilidad oral (Blondy et al., 2020). Sin embargo, luego de su administración IV, sus aplicaciones clínicas son limitadas, presenta un tiempo de vida media corto (15-20 min) debido al rápido metabolismo y efectos secundarios severos, como mielosupresión, dermatitis, cardiotoxicidad y trastornos gastrointestinales, los cuales, se asocian con su alta distribución *in vivo* inespecífica, por lo que se ha informado que tan solo entre el 1-3% de la dosis original de 5-FU contribuye a la citotoxicidad de las células tumorales (Gao et al., 2017; Hosseinifar et al., 2018; Pretel et al., 2017; Tawfik et al., 2017; Yuan et al., 2018). El principal problema es el fracaso del tratamiento por la incapacidad del fármaco para actuar particularmente en el sitio objetivo, lo que conduce a una falta de especificidad y a los efectos secundarios graves (Tummala et al., 2015). Por otra parte, la curcumina (CUR), un pigmento amarillo de la cúrcuma; ha demostrado a través de diversos estudios su actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena, al ser capaz de regular múltiples vías de

señalización (Wu et al. 2020). A través de varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado su actividad anticancerígena en cáncer de CC (Selvam et al. 2019). Desafortunadamente, su aplicación contra el cáncer está limitada debido a la baja solubilidad en agua, mala absorción en el tracto gastrointestinal, el metabolismo rápido y su degradación en medio ácido. Para superar las limitaciones de biodisponibilidad de la CUR se han trabajado en nanoformulaciones que mejoran su absorción y la focalización de sus efectos celulares. Una buena formulación debería mostrar mayor actividad anticancerígena en comparación con la CUR libre y, al mismo tiempo efectos secundarios mínimos (Wong et al. 2019).

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar un sistema de liberación oral a base de nanogeles pegilados de CAM10 cargados con 5-FU y CUR, que permitirán evaluar la liberación del fármaco anticancerígeno a partir de condiciones *in vitro* que simulen la liberación en el colon en dependencia del pH. Esto podría reducir la toxicidad sistémica que es el principal factor limitante en el tratamiento del cáncer de colon y permitiría un incremento de la dosis comparado con las estrategias de tratamiento existentes.

## Antecedentes

Uno de los nanoportadores más utilizados y con buenos resultados como sistemas de administración de fármacos en la terapia del cáncer han sido las nanopartículas (NPs) poliméricas debido a sus propiedades únicas: pueden transportar y administrar de manera más efectiva medicamentos que son inestables en fluidos biológicos y que no se pueden difundir fácilmente a través de la barrera mucosa; pueden transitar directamente y adherirse a la mucosa, las NPs cargadas con fármacos pueden desempeñar un papel a nivel tisular o celular (P. Li et al., 2015). En un estudio se sintetizaron NPs de quitosano cargadas con 5-FU y recubiertas con diferentes proporciones del polímero Eudragit S-100, el cual, se disuelve a pH colónico. Como resultados en general para la relación fármaco: polímero 1:3, se obtuvieron nanopartículas con formas esféricas, con un rango de tamaño de 139 nm, una superficie lisa, valores de índice de polidispersión (PDI) < 0.2 y un Potencial Zeta negativo. De igual manera, mostraron una eficiencia de encapsulación del 69%, una carga de fármaco de 28% y una liberación del 82% a las 24 h después de alcanzar un pH básico (7.0), esto último atribuido a los grupos carboxilo presentes en Eudragit S-100 que se ionizan en medios neutros a alcalinos; mientras que las NPs sin recubrimiento liberaron el 70% del fármaco en pH ácido, antes de llegar al líquido colónico debido a la degradación del quitosano. Por lo tanto, estas NPs se consideraron como un excelente nanoportador de fármacos para liberación controlada y específica en colón (Tummala et al., 2015). Como se demostró en el artículo anterior, se han desarrollado enfoques para dirigir la liberación del 5-FU directo en el colon, entre ellos, se encuentra la sensibilidad al

pH, ya que estos valores varían a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) (P. Li et al., 2015). Por otro lado, se han investigado los NGs como portadores de fármacos sensibles a pH debido a varias ventajas características, como su facilidad de síntesis, tamaño controlado y funcionalización (Cuggino et al., 2016). En un estudio, se sintetizaron nanogeles copoliméricos de ácido metacrílico y acrilato de 2-etilhexilo (MAEHA) mediante una técnica de copolimerización en microemulsión que fueron cargados con el fármaco 5-FU y, por medio de los resultados obtenidos, se concluyó que este copolímero podría ser un buen sistema de administración de fármacos para el colon, ya que presentó una eficiencia de encapsulación del 80%; un diámetro medio de 150 nm y un PDI de 0.100; mayor citotoxicidad en una línea celular de cáncer de colon (HCT-116) en comparación con el 5-FU libre y, mostró un comportamiento de liberación de fármaco sensible a pH al presentar una cinética de liberación *in vitro* sostenida a pH básico (7.0 y 7.8), similar a la que se encuentra en la región colónica y solo poca concentración de fármaco fue liberado en pH ácido (2.0), lo que indicó una buena estabilidad de los nanogeles para una liberación controlada (Ashwanikumar et al., 2012).

En otro artículo, sintetizaron nano/microgeles sensibles a la temperatura y al pH utilizando N-isopropilacrilamida (NIPAAm) como material sensible a la temperatura y ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (2MBA) como molécula anfifílica sensible al pH. Estos dos monómeros se incorporaron dentro de NPs con una capa exterior formada por poli(etilenglicol) metacrilato de éter metilo (PEGMAM), que actúa como estabilizador durante la polimerización, y estos fueron entrecruzados con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) o 9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro (5.5)-undecano (DVA). Se utilizó una concentración de los monómeros al 1%p/v ya que

presentaba una dispersión blanca, y a 2%p/v resultó en la formación de un precipitado y, un iniciador al 2%mol. Primero, se sintetizaron nano/microgeles con diferentes proporciones de NIPAAm: PEGMAM (70:30%p) y obtuvieron distribuciones de tamaño monomodales y un PDI de 0.14 a 0.18. También, evaluaron el efecto de la concentración con cada entrecruzante en el tamaño y la distribución de estos nano/microgeles; con EGDMA se encontró que a medida que incrementaba su concentración, también incrementaba el diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) debido a su carácter hidrofílico, se hincha y permite una mayor entrada de monómeros durante su polimerización, mientras que con DVA, se observó lo contrario ya que no se hincha y no crecían tanto las partículas. A concentraciones superiores de 5%mol (10%mol) de EGDMA y DVA, se formaba un precipitado que indicaba la presencia de macrogeles, mientras que a concentraciones menores (1%mol) no eran estables al proceso de recuperación, por lo que se optó por utilizar la concentración de 5%mol para ambos entrecruzantes. Luego de la incorporación de monómero 2MBA a los nano/microgeles de NIPAAm, se midió el potencial Z a diferentes valores de pH y se observó que este valor disminuía a medida que aumentaba el pH, sobre todo al utilizar DVA por la mayor densidad de carga, ya que los nanogeles eran más pequeños y presentaban una mayor área externa. También se evaluó el efecto de la temperatura y el tamaño mediante DLS a diferentes pH y se encontró que el tamaño de los nano/microgeles aumentaba a medida que incrementaba el pH. Se realizaron estudios de estabilidad en donde se encontró que los nano/microgeles que contenían 2MBA reticulados con 5%mol de EGDMA o DVA producen distribuciones monomodales después de la reconstitución lo que indicó que son estables luego del proceso de recuperación. Algo importante que se evaluó

también fue el uso de DVA, puesto que se trata de una molécula lábil a ácido, por lo que nano/microgeles reticulados con ese entrecruzante se almacenaron por diferentes periodos de tiempo a pH de 5.5, encontrando posteriormente distribuciones de tamaño muy variadas, por lo que podría ser utilizado para administración de fármacos antitumorales debido a que el pH extracelular de los tumores sólidos es significativamente más ácido que el de los tejidos normales (Serrano-Medina et al., 2012).

Finalmente, en un artículo se formaron complejos con fármacos catiónicos (labetalol, propranolol y diltiazem) y polielectrolitos con diferentes longitudes de cadena lateral, poli-(ácido 6-metacriloilamido hexanóico) (PCAM5), poli-(ácido 8-metacriloilamido octanóico) (PCAM7) y poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico) (PCAM10) con los que se realizaron cinéticas de liberación de los fármacos a diferentes pHs (1.2, 6.8 y 7.4) y, en general, se obtuvo que conforme se incrementó el pH, se incrementaba la liberación; sin embargo, PCAM10 presentó una menor cinética de liberación debido a su mayor hidrofobicidad, aunque, la liberación de diltiazem fue superior al 70% en pH 1.2 debido a la alta solubilidad del medicamento. Se concluyó que estos polímeros son polielectrolitos hidrofóbicos que forman sales iónicas insolubles en agua cuando se conjugan con fármacos catiónicos y que presentan una cinética de liberación dependiente del tamaño de su cadena lateral, del pH del medio y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco que se quiera utilizar, por lo que podrían ser buenos candidatos para una liberación sostenida en el intestino (Magaña et al., 2017). Cabe mencionar, que en este

artículo no se sintetizaron NGs; sin embargo, aporta información importante sobre el monómero CAM10 utilizado en esta tesis.

## **Justificación**

El CCR es uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en el mundo (Flores 2020), por lo que es relevante encontrar nuevos y mejores tratamientos de los ya existentes dado que con los que se cuentan en la actualidad se presentan demasiados inconvenientes; por su parte la cirugía puede tener complicaciones durante o después de la cirugía como lo es la presencia de coágulos, infecciones, sangrado e incluso pueden presentarse problemas de cicatrización, además de que los pacientes no tienen la capacidad de ingerir alimentos durante algunos días después de la operación; el otro tratamiento altamente empleado es la quimioterapia, que resulta ser muy tóxico y presentar múltiples reacciones adversas en los individuos, al tener un efecto sistémico, y la capacidad de alterar tanto el funcionamiento de las células sanas como las enfermas. En esta búsqueda se ha explorado el uso de curcumina (CUR), un componente natural de la cúrcuma, que ha demostrado poseer varios efectos positivos para la salud, entre ellos, su efecto anticancerígeno. Existen diversos estudios que demuestran su capacidad de regular múltiples vías de señalización celular, cruciales en el desarrollo y la progresión del cáncer, pero su aplicación clínica es nula debido a la pobre biodisponibilidad que presenta. Dicho problema puede superarse con el desarrollo de nano formulaciones que contengan CUR y 5-FU. Estos sistemas de administración basados en nanotecnología se emplean

ampliamente para mejorar la administración de fármacos poco solubles en agua, además el sistema confiere características especiales como una mejor absorción celular *in situ* (Wong et al. 2019). En este proyecto se obtuvieron nanogeles mediante la polimerización por el método de emulsión sin detergente, para la liberación de CUR y 5-FU en una línea celular de CCR, se logrará empleando materiales sensibles al pH, estos vehículos acarreadores son prometedores para el diseño de una futura terapia segura, eficaz y con mínimos efectos tóxicos.

### **Hipótesis**

Los nanogeles de CAM10 preparados por emulsión sin detergente, estabilizados con PEGMAM y entrecruzados con un entrecruzante lábil en ambiente reductivo, tiene capacidad de liberar fármacos anticancerígenos a tumores en el colon.

### **Objetivos**

#### **Objetivos generales**

- a) Obtener y caracterizar nanogeles de ácido 11-matacriloilamido undecanóico (CAM10) sensibles al pH y al ambiente REDOX, estabilizados con PEGMAM.
- b) Estudiar la aplicación de los nanogeles al cargado de curcumina y 5-fluoruracilo, y la liberación de estos en respuesta a cambios en el medio ambiente.

## **Objetivos específicos**

- a) Sintetizar nanogeles de CAM10/EGDMA y CAM10/BAAC mediante polimerización en emulsión sin detergente con metacrilato de polietilenglicol (PEGMAM).
- b) Caracterizar a los nanogeles vía dispersión de luz dinámica (DLS) para determinar el tamaño, número de distribuciones, el efecto del pH y el ambiente redox en el diámetro hidrodinámico.
- c) Caracterización de la morfología y el tamaño de las nanopartículas por Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM). Para mostrar la morfología y confirmar el tamaño de las nanopartículas.
- d) Cargar los nanogeles con CUR y 5-FU equilibrando las nanopartículas en una solución que contenga a los fármacos. Para determinar la capacidad de carga y eficiencia de carga de las nanopartículas.
- e) Obtener estudios de cinética de liberación de curcumina y 5-fluorouracilo, evaluando el efecto del pH.
- f) Medir la citotoxicidad de los nanogeles cargados por el método de MTT y compararla con los fármacos libres en una línea celular de cáncer. Para determinar la biocompatibilidad de los materiales y medir su toxicidad.
- g) Realizar estudios la hidrólisis de nano partículas con GSH a diferentes concentraciones para comprobar su respuesta redox en condiciones de biodegradación.

## **CAPÍTULO II. TEORÍA GENERAL**

## **Generalidades de cáncer de colon**

Entendemos por CC, también llamado cáncer colonrectal (CCR), como el crecimiento incontrolado de las células del colon y/o el recto. Los tumores de CCR pueden surgir en una o todas las capas: mucosa, muscular y serosa. El adenocarcinoma se origina en las glándulas. El adenocarcinoma es el más frecuente de los CC, con un 90% de incidencia. Los linfomas, los sarcomas y los melanomas son infrecuentes (Flores 2020).

## **Tratamientos para el cáncer de colon**

El cáncer de colon se puede tratar mediante cirugía, criocirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida (Gao et al., 2017; Tummala et al., 2015). El tratamiento seleccionado va a depender de la localización, el tamaño y la extensión de la propagación del tumor, así como de la situación de salud en la que se encuentre el paciente (Anitha et al., 2016). Además, dependiendo del estadio del cáncer que se presente, se pueden combinar dos o incluso tres tipos de tratamientos al mismo tiempo o uno antes o después de otro (Y. S.R. Krishnaiah et al., 2002). Se considera como único tratamiento curativo a la cirugía, especialmente para las etapas iniciales del tumor (Blondy et al., 2020). La radioterapia realizada antes o después de la operación, reduce la recurrencia pélvica pero no parece prolongar la supervivencia, por eso, no es efectivo como tratamiento primario para cáncer de colon (Maspes et al., 2021). Por otro lado, la quimioterapia es considerada la estrategia terapéutica adyuvante principal para el cáncer de colon antes o después

de la cirugía en estadios más avanzados, no obstante, el impacto en el pronóstico de la enfermedad no se considera muy significativo debido a que los medicamentos quimioterapéuticos no diferencian entre células cancerosas y células normales (Tawfik et al., 2017) lo que provoca una gran variedad de efectos secundarios graves, tales como neutropenia, fatiga, diarrea, náuseas, vómitos, anemia, hepatotoxicidad, entre muchos otros; de hecho, estos efectos en los tejidos y órganos sanos son una de las principales razones de la alta tasa de mortalidad de los pacientes con cáncer (Senapati et al., 2018). Además, la dosis sistémica máxima necesaria y permitida se ve limitada por la distribución inespecífica de los fármacos, dando como resultado concentraciones inadecuadas en el sitio tumoral, por lo que se necesitan terapias más dirigidas (Banerjee et al., 2017).

Son muchos los agentes anticancerígenos que se han estudiado y desarrollado a lo largo de varios años (Tawfik et al., 2017), la mayoría de ellos se administra mediante infusión intravenosa y, generalmente, se requiere que los pacientes sean hospitalizados, lo que, además, llega a conducir a un cumplimiento deficiente del tratamiento (Chivere et al., 2020). Debido a esto, la quimioterapia oral ha atraído más la atención de los investigadores ya que evita la incomodidad de las inyecciones y se puede realizar en el hogar, lo que mejoraría la cooperación y la calidad de vida de las personas con cáncer de colon, entre algunas otras ventajas, como una mayor exposición de los fármacos antitumorales a las células cancerígenas, lo que podría incrementar la eficacia del medicamento y disminuir los efectos citotóxicos sistémicos (Pangeni et al., 2016).

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado varios agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer de

colon, entre ellos se incluyen 5-FU, avastatina, bevacizumab, irinotecan, capecitabina y oxaliplatino, para ser utilizados solos o en combinación (Sharma et al., 2017; R. Wang et al., 2019). Los 3 agentes quimioterapéuticos utilizados para tratar un estadio temprano del cáncer de colon son el 5-FU, capecitabina y, oxaliplatino (C. Wu, 2018). También es muy utilizada la leucovorina como potenciador del efecto de los medicamentos citotóxicos, como el 5-FU que se ha utilizado en terapia adyuvante por un periodo de 6 meses (Guler & Ovey, 2018; C. Wu, 2018). El oxaliplatino también es utilizado ya que mejora la eficacia de esta combinación en pacientes con metástasis (André et al., 2004). El bevacizumab, por otro lado, es un anticuerpo monoclonal que también ha sido aprobado por la FDA para utilizarse como tratamiento en cáncer de colon metastatizado, este se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o a su receptor, evitando la promoción de angiogénesis en el tumor, también se encuentran disponibles el ramucirumab y el aflibercept. Por otro lado, la capecitabina es un pro-fármaco administrado por vía oral que se absorbe a través de la pared gastrointestinal en forma intacta y, subsecuentemente, es convertido en 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) por las enzimas carboxilesterasa (CES) y citidina desaminasa (CDA) en el hígado y, después, 5'-DFUR es transformada en 5-FU por timidina fosforilasa (TP) y/o uridina fosforilasa (UP), TP tiene una alta concentración en mucho tejidos tumorales; la capecitabina puede utilizarse tanto en terapia adyuvante así como en un estadio de metástasis, sin embargo, sus ventajas son contradictoras ya que en algunos estudios clínicos con pacientes con cáncer de colon en estadio III se ha revelado que la monoterapia con capecitabina ha presentado una baja incidencia de efectos secundarios tóxicos en comparación con la monoterapia de 5-

FU/leucovorina, mientras que en otros varios estudios se ha encontrado que la capecitabina presenta una toxicidad similar a la del 5-FU (Vodenkova et al., 2020; C. Wu, 2018). Para mejorar la eficacia en pacientes con metástasis en hígado se suele administrar la quimioterapia mediante infusión directamente en la arteria hepática o vena porta pero, este tratamiento resulta ser muy tóxico, caro y no conduce a una prolongación de la supervivencia (Maspes et al., 2021).

## **Curcumina**

La fórmula química de CUR es C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, con nomenclatura IUPAC de [1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] y peso molecular de 368,38 Da (Priyadarsini, 2014 ). CUR muestra tautomerismo de ceto-enol con dos formas de isómero, forma de enol y forma de β-diceto. El isómero predominante depende de la naturaleza del disolvente. En solución ácida y neutra, predominará la forma ceto; mientras que en medio alcalino predominará la forma enólica estable (Shen y Ji, 2007; Liu et al., 2013). La forma enol es más estable en comparación con la forma diceto en 7,75 kcal/mol, debido a la presencia de un fuerte enlace de hidrógeno interno y a la conjugación extendida a lo largo de la molécula en la forma enol estable (Shen y Ji, 2007). CUR tiene un valor de log P de 2,5, lo que le permite difundirse fácilmente a través de las membranas celulares (Fujisawa et al., 2004). CUR es soluble en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido, metanol, etanol y cloroformo, pero insoluble en agua. CUR exhibe dos fuertes bandas de absorción: una entre 410 y 430 nm en la región visible; y otro a 265 nm en la región ultravioleta. Se informó que los tres valores de pKa de CUR son 7.8, 8.5 y 9.0, atribuidos por la

disociación del protón enólico y dos protones fenólicos en CUR (Tønnesen et al., 2002). La estimación de los valores de pKa se basa en resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de absorción. Sin embargo, aún es discutible si asignar el valor de pKa más bajo a la disociación del protón enólico o del protón fenólico debido a las diferencias en las técnicas experimentales (Priyadarsini, 2014). A pH fisiológico, CUR se degrada rápidamente, donde la autooxidación es la principal vía de degradación. Los primeros productos de degradación identificados son responsables del envenenamiento por topoisomerasa, lo que sugiere que la transformación oxidativa es necesaria para generar un compuesto activo. El envenenamiento por topoisomerasa es importante para mediar las propiedades anticancerígenas de muchos medicamentos contra el cáncer en uso clínico (Wong et al. 2019).

La administración oral de CUR se tolera bien en dosis de hasta 12 g/día en estudios clínicos. Sin embargo, a menudo tiene poca biodisponibilidad debido a la baja solubilidad acuosa, mala absorción, alto metabolismo de primer paso y excreción rápida. CUR tiene una solubilidad muy baja de 0,6 µg/ml en agua y se degrada rápidamente en un entorno alcalino (Naksuriya et al., 2014). CUR, sola o en combinación, muestra actividades quimiopreventivas y anticancerígenas con usos informados contra varios tipos de cáncer, incluido el colorrectal (Shehzad et al., 2013), pancreático (Ma et al., 2014), mama (Lv et al., 2014), próstata (Guo et al., 2013), pulmón (Jin et al., 2015) y cáncer oral (Zhen et al., 2014). CUR ejerce sus efectos al regular a la baja múltiples vías de señalización celular, que incluyen NF-κB, STAT3, proteína-1 activada (AP-1) y respuesta de crecimiento epidérmico-1 (Egr-1), que son cruciales en el desarrollo y progresión de cáncer. Estos factores

de transcripción generalmente se regulan en la mayoría de los cánceres para ayudar en la proliferación celular, la angiogénesis y la formación de tumores. La regulación a la baja de las vías de NF- $\kappa$ B modula la expresión de una variedad de genes como ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL, ciclooxigenasa 2 (COX-2), metaloproteinasa de matriz (MMP)-9, lo que promueve la detención del ciclo celular. suprimiendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis (Zhou et al., 2011; Kunnumakkara et al., 2017). CUR también modula tanto AP-1 como STAT3 en la proliferación celular de células cancerosas. La regulación a la baja tanto de AP-1 como de STAT3 da como resultado un retraso en el crecimiento de las células cancerosas. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un objetivo crucial en el tratamiento del cáncer, ya que se puede encontrar en muchos tumores sólidos, incluido el CCR. La regulación a la baja de EGFR está asociada con la inhibición del crecimiento, la invasión y la metástasis de las células cancerosas (Kunnumakkara et al., 2017). Se descubrió que CUR suprime la expresión de EGFR, mediada por la reducción de la actividad de Egr-1 en células de cáncer de colon Caco2 y HT29, lo que inhibe el crecimiento de células de cáncer de colon (Chen et al., 2006). Además, CUR también podría promover la apoptosis a través de la regulación al alza del gen supresor de tumores p53, lo que provoca la muerte celular en la fase G2. El efecto aguas abajo de la activación de p53 conduce a un efecto neto de apoptosis en células de carcinoma de colon a través de la regulación negativa de los genes antiapoptóticos Bcl-2/Bcl-xL y la regulación positiva de los genes proapoptóticos Bax (Sa y Das, 2008). A pesar de tener las propiedades anticancerígenas mencionadas anteriormente, su escasa biodisponibilidad oral sigue siendo el principal inconveniente, lo que limita su potencial clínico (Anand et al., 2007). Como

resultado, estos problemas han llevado al desarrollo de nanoformulaciones de CUR en la búsqueda de mejorar la administración de CUR para obtener mejores resultados terapéuticos.

### **Polimerización en emulsión sin detergente**

La polimerización en emulsión sin detergente, es una polimerización en emulsión, pero sin utilizar tensoactivos. Se piensa que el método se desarrolla en cuatro etapas: durante de la primera etapa, el medio de polimerización es acuoso, donde uno de los monómeros es soluble en el medio y el otro monómero es hidrofóbico, el cual forma la fase dispersa; en la segunda etapa, el monómero hidrofóbico es primeramente polimerizado, posteriormente comienzan a crecer cadenas de segmentos hidrofóbicos dependiendo del radio de reactividad entre el monómero hidrofóbico y el monómero hidrofílico en el medio acuoso. En la tercera etapa, los radicales del polímero son naturalmente estabilizados por la formación de micelas de autoensamblaje en agua, después del crecimiento del peso molecular debido a la selectividad y miscibilidad, donde las cadenas hidrofóbicas activadas son recogidas en el núcleo y las cadenas hidrofóbicas emanan del núcleo. En la última fase, la polimerización procede dentro del núcleo de las micelas. Por lo tanto se puede obtener microesfera poliméricas con tamaños de distribución desde los 100 nm hasta 1  $\mu$  m (Motokawa et al., 2005). En la polimerización en emulsión sin detergente, la estabilidad de las microgotas de monómero, dependen de la absorción de las moléculas del iniciador (incluyendo los iones) o del monómero hidrofílico. El efecto estabilizante de estas especies podría ser débil, sin embargo a la temperatura de polimerización (40-80°C), (Henmei et al., 2001).

La diferencia con los sistemas de polimerización en emulsión, la superficie de la emulsión sin detergente, está completamente limpia por no utilizar emulsificantes, por otra parte la superficie se puede modificar químicamente, exponiendo diversos grupos funcionales, por lo que este método es de interés, especialmente en ingeniería biomédica y aplicaciones farmacéuticas (Bastos et al., 1996; Tamai,H et al., 1998).

### **CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL**

### **III.1. Materiales y reactivos**

Ácido 11-metacriloilamino undecanóico (CAM10), El CAM10 fue proporcionado por el Laboratorio de Biofarmacia FCQI, UABC.

Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (sigma-aldrich)

Persulfato de amonio (APS)

Dodecilbenceno sulfonato de sodio (DBS) (sigma-aldrich)

5-fluorouracilo (99% TLC, sigma-aldrich)

Curcumina (sigma-aldrich)

Gas nitrógeno

Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Buffers de 1.2, 6.8 y 7.4

Agua destilada

Alcohol etílico de 96°

Pinzas de diálisis

Soporte universal con pinzas

Matraz bola

Parrillas con agitación

Agitador magnético

Termómetro

Balanza analítica

Charolas para pesar

Jeringas para gas

Vasos de precipitados de 10 y 100 ml

Probeta de 100 ml

Baño de aceite

Viales color ámbar

Pipetas transfer

Papel parafilm

Matraces volumétricos de 10 ml

Viales color ámbar  
Pipetas transfer  
Papel parafilm  
Matraces volumétricos de 10 ml  
Espátulas  
Tubos cónicos Falcon de 50 ml  
Micropipetas de 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l  
Cubetillas para DLS  
Celdas de potencial Z  
Celdas para UV-visible

### **III.1.2. Equipos**

Dispersión de luz dinámica (DLS) Zetasizer Nano-Zs series, de marca Malvern Instruments, modelos ZEN3500 con láser verde de 532 nm  
Potenciómetro  
Espectrofotómetro ultravioleta-visible  
UV-VS spectrophotometer Beckman Coulter DU520 con un dual cell peltrier accesory  
Sistema liofilizador equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 ciclos;  
ultracentrífuga modelo VWR Clinical 50 (Beckman coulter)  
balanza analítica (Pioneer, OHAUS) para pesar muestras o reactivos  
Baño de control de temperaturas de la marca VWR International Shel Lab modelo 1217  
Equipo de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, modelo JSM7800 F Prime

## **III.2 Métodos**

### **III.2.1 Purificación de etilenglicol dimetacrilato**

Se corrió 2 ml de EGDMA por una columna empacada con resina removedora de hidroquinona y metil hidroquinona para remover el inhibidor de EGDMA y se dejó en refrigeración para posteriores estudios.

### **III.2.2 Síntesis de nanogeles mediante el método de polimerización en emulsión sin detergente**

Se utilizó un método de polimerización en emulsión sin detergente para preparar los nanogeles de CAM10 utilizando EGDMA o BAAC como entrecruzantes. Se realizaron dos tipos de reacciones diferentes una utilizando CAM10 y EGDMA como entrecruzante y el otro tipo fue utilizando CAM10 y BAAC como entrecruzante, en ambas reacciones se utilizó PEGMAM como estabilizante (Tabla 1 y 2). Todos los componentes se disolvieron en 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente para formar una solución acuosa al 1% w/v.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para la síntesis de los nanogeles y sus cantidades reacción 1.

<b>Reacción 1</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidades</b>
Monómero	CAM10 1%	0.5 g
Entrecruzante	EGDMA 5%	0.0257 mol
Estabilizante	PEGMAM	0.15 g
Iniciador	APS 2%	0.01186 mol

**Tabla 2.** Reactivos utilizados para la síntesis de los nanogeles y sus cantidades Reacción 2.

<b>Reacción 2</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidades</b>
Monómero	CAM10 1%	0.5 g
Entrecruzante	BAAC 5%	0.02409 mol
Estabilizante	PEGMAM	0.15 g
Iniciador	APS 2%	0.01186 mol

En un matraz bola se adicionaron por separado las soluciones acuosas al 1% con respecto al monómero; cada sistema se desgasificó con nitrógeno durante 30 minutos para eliminar el exceso de oxígeno presente; posteriormente las soluciones se llevaron a baño de aceite, hasta alcanzar la estabilidad de la temperatura de 75°C; se adicionó el iniciador de la polimerización (APS) al 2%ww, con agitación constante, se continuó la polimerización por 2 horas. se observaron como un líquido

blanco semitransparente. Las nano partículas obtenidas se dializaron con agua destilada a temperatura ambiente mediante el uso de una membrana de diálisis (corte de peso molecular = 14.000) por 48 horas con cambio de agua cada 12 horas para purificar el producto.

### **III.2.3 Caracterización de los nanogeles**

**III.2.3.1. Diámetro hidrodinámico:** Se utilizó el equipo de Dispersión de Luz Dinámica Zetasizer Nano-Zs series con la finalidad de caracterizar la formación y el tamaño de los nanogeles en las emulsiones obtenidas. Se diluyeron 1 ml de muestra aforando a un volumen de 10 ml de agua destilada y filtrada, se procedió a correr la muestra en el equipo a 25°C con medios de diferentes pH (1.2, 6.8, 7.4 y agua), obteniéndose el % en volumen del diámetro hidrodinámico de las nano partículas.

**III.2.3.2. Potencial Zeta:** Se utilizó el equipo ZetaSizer nano para analizar el potencial Z con la finalidad de determinar la carga de la superficie de los nanogeles. Se tomó 1ml de las emulsiones previamente purificadas y se diluyeron en 10 ml de buffer de diferentes pH (6.8, 7.4 y agua); cada una de las diluciones se colocaron en cubetillas para posteriormente analizar el potencial Z.

**III.2.3.3. Imágenes FESEM:** Se adquirieron imágenes de microscopía electrónica de barrido (FESEM) de los nanogeles con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Para ello, esparcimos una gota de dispersión de nanogeles (0.4% en peso) sobre la superficie de una rejilla de cobre y carbono de malla 400. Se añadió una gota de acetato de uranilo (2% en peso) a la rejilla de cobre de carbono. Las muestras se secaron en horno de vacío a 22°C durante 24h.

**III.2.4 Liofilización y reconstitución de los nanogeles:** Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado de los nanogeles sintetizados con la finalidad de aplicarlos a la parte experimental de cargado y liberación de fármacos; analizando las modificaciones y/o la estabilidad en su morfología, su estructura y su radio hidrodinámico.

**III.2.4.1. Liofilización:** Se tomaron los 50 mL de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas, se congelaron en diferentes viales, 10 ml por cada vial, posteriormente se colocaron los viales con las emulsiones congeladas en el liofilizador por 48 horas para obtener las muestras completamente secas.

**III.2.4.2. Reconstitución:** Para reconstituir el material, en un vial se adicionaron 10 mg del polvo liofilizado en 5 mL de agua desionizada bajo agitación constante por 24 horas. Obteniendo la emulsión reconstituida, se tomaron 1ml y se diluyeron en 10 ml de agua. Se realizó la caracterización de las muestras reconstituidas vía DLS para observar los cambios de los nanogeles con respecto al proceso de liofilización y reconstitución.

### **III.2.5 Degradación de nanogeles de CAM10-BAAC (hidrólisis de nanogeles)**

Se pusieron 10 mg de nanogeles liofilizados (en polvo) con 10 ml de buffer correspondiente (1.2,6.8 y 7.4) en un frasco y se le adiciono a cada frasco 0.5 ml de Tween 80 (5% con respecto al buffer). Se vació el contenido de los frascos en cada uno de los vasos de un recirculador a 37°C con agitación constante y se les adiciono a cada vaso los miligramos de glutatión correspondiente a las diferentes

concentraciones (que se muestran en la siguiente tabla). Se tomaron muestras de 1 ml cada 15 minutos y se midió el tamaño de los nanogeles hasta los 60 minutos.

**Tabla 3. Concentraciones de glutatión**

<b>Concentración de Glutatión (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Miligramos de glutatión</b>
<b>0</b>	0
<b>2</b>	6.15
<b>4</b>	12.30
<b>6</b>	18.45
<b>8</b>	24.6
<b>10</b>	30.75

**III.2.6. Cargado de los nanogeles con 5-FU:** Para el cargado de los nanogeles con 5-FU primero se preparó la disolución de los nanogeles (Solución A). En un vial con tapadera se disolvieron 100 mg de nanogeles en 20 ml de agua con agitación constante durante 48 h. El siguiente paso fue preparar la solución acuosa de 5-FU (Solución B) en un vial, para la cual, se pesaron 30 mg de 5-FU y se disolvieron con 10 ml de agua con agitación constante durante 24 a 48 h. Pasado el tiempo, la solución B se agregó a la solución A gota a gota y se dejó en

agitación por 48 h. La mezcla se colocó en un tubo cónico Falcón de 50 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 h. El sedimento se congeló durante 48 h. Una vez que se obtuvo el sedimento congelado se procedió a liofilizarlo por 48 h. Finalmente, se realizó la cuantificación del cargado de los nanogeles colocando en un frasco con tapadera 5 mg del liofilizado en 10 ml de etanol, se agitó vigorosamente y se tomó 1 ml y se colocó en una cubetilla para leerse en el espectrofotómetro a 275 nm para determinar la capacidad y la eficiencia de cargados con las ecuaciones 1 y 2 (ANEXO 5) y utilizando la curva de calibración para el cargado de 5-FU (ANEXO 3).

**III.2.7. Cargado de los nanogeles con curcumina:** Para el cargado de los nanogeles con CUR primero se preparó la disolución de los nanogeles (Solución A). En un vial con tapadera se disolvieron 100 mg de nanogeles en 20 ml de agua con agitación constante durante 48 h. El siguiente paso fue preparar la solución acuosa de CUR (Solución B) en un vial, para la cual, se pesaron 30 mg de CUR y se disolvieron con 3 ml de etanol con agitación constante, la solución B se agregó a la solución A gota a gota y se dejó en agitación sin tapadera para eliminar el etanol por 48 h. La mezcla se colocó en un tubo cónico Falcón de 50 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 h. El sedimento se congeló durante 48 h. Una vez que se obtuvo el sedimento congelado se procedió a liofilizarlo por 48 h. Finalmente, se realizó la cuantificación del cargado de los nanogeles colocando en un frasco con tapadera 5 mg del liofilizado en 10 ml de etanol, se agitó vigorosamente y se tomó 1 ml y se colocó en una cubetilla para leerse en el espectrofotómetro a 427 nm para determinar la capacidad y la eficiencia de

cargados con las ecuaciones 1 y 2 (ANEXO 4) y utilizando la curva de calibración para el cargado de CUR (ANEXO 2).

**III.2.8. Cinética de liberación *in vitro* de CUR:** Para los estudios de liberación controlada, se agregó directamente 3.8 mg de nanopartículas liofilizadas entrecruzadas con BAAC cargadas y 6 mg de nanopartículas entrecruzadas con EGDMA en una membrana de diálisis cada uno y se le adiciono 3 ml de solución tampón correspondiente a diferentes pH (1.2, 6.8, y 7.4), en otra membrana de diálisis se colocó una solución de referencia con el contenido de fármaco cargado en 3.8 y 6 mg de nano partículas cargadas (1 mg de Fármaco de referencia). Cada tubo de diálisis pre llenado y fijado en cada extremo por pinzas de diálisis se introdujo en 50 ml de medio de liberación dentro de un frasco que contenía la solución tampón correspondiente (pH 1.2, 6.8 y 7.4). El frasco se colocó dentro de un baño de agitación que funcionó a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm. Las membranas de diálisis permitieron la difusión de CUR en el medio de liberación mientras retuvieron las NPs. Se extrajeron alícuotas del medio (2 ml) a los tiempos de 0.25, 0.5, 0.75,1, 2,3, 4,5,6,7, 8,9,10,11, 12, 24, 36,48,60,72,84,96,108 y 120 h; se reemplazó el volumen con medio fresco en cada tiempo de muestreo. La fracción liberada de CUR se calculó a partir de mediciones de UV a 427 nm y luego se cuantificó usando la curva de calibración previamente preparada específicamente para 5-FU. Para calcular la fracción liberada del fármaco se utilizaron las curvas de calibración a diferentes pH (ANEXO 6).

**III.2.9. Cinética de liberación *in vitro* de 5-FU:** Para los estudios de liberación controlada, se agregó directamente 5 mg de nanopartículas liofilizadas entrecruzadas con BAAC cargadas y 8mg de nanopartículas entrecruzadas con EGDMA en una membrana de diálisis cada uno y se le adiciono 3 ml de solución tampón correspondiente a diferentes pH (1.2, 6.8, y 7.4), en otra membrana de diálisis se colocó una solución de referencia con el contenido de fármaco cargado en 5 y 8 mg de nano partículas cargadas (1 mg de fármaco de referencia). Cada tubo de diálisis pre llenado y fijado en cada extremo por pinzas de diálisis se introdujo en 50 ml de medio de liberación dentro de un frasco que contenía la solución tampón correspondiente (pH 1.2, 6.8, y 7.4). El frasco se colocó dentro de un baño de agitación que funcionó a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm. Las membranas de diálisis permitieron la difusión de 5-FU en el medio de liberación mientras retuvieron las NPs. Se extrajeron alícuotas del medio (2 ml) a los tiempos de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2,3, 4,5,6,7, 8,9,10,11, 12, 24 y 36 h; se reemplazó el volumen con medio fresco en cada tiempo de muestreo. La fracción liberada de 5-FU se calculó a partir de mediciones de UV a 275 nm y luego se cuantificó usando la curva de calibración previamente preparada específicamente para 5-FU. Para calcular la fracción liberada del fármaco se utilizaron las curvas de calibración a diferentes pH, (ANEXO 7).

### **III.2.10. Ensayo de viabilidad de los nanogeles cargados con CUR y 5-FU**

La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de toxicología *in vitro* basado en MTT. Este es un método simple en el que el MTT es captado y reducido

por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble de color morado, formazán. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular; además, permite obtener información acerca de la citotoxicidad del compuesto que se evalúa. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado en el proceso (Puértolas Soto L., 2015). La metodología seguida se describe a continuación: Las células de fibroblastos, se cultivaron en una placa de 96 pocillos ( $10 \times 10^4$  células / pocillo) y se incubaron en condiciones de crecimiento estándar durante 24 horas seguido de la adición de los diferentes grupos de tratamiento:

Grupos	Concentraciones µg/ml							
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
5-FU libre	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
5-FU BAAC	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
5-FU EGDMA	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
CUR libre	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
CUR BAAC	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
CUR-EGDMA	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400

Se utilizó como concentración inicial para las diluciones, 1mg en 1.5 ml (0.6 mg/ml) de 5-FU y 1.5 mg en 1.5 ml (1 mg/ml) de nanogeles libres y nanogeles cargados. En todos los ensayos, las células no tratadas fueron utilizadas como

control negativo (C-) y 5% de DMSO se añadió como control positivo de muerte celular (C+). Las células fueron incubadas por 24 h. Luego del tiempo de tratamiento, se añadió una solución de MTT (10 µL) a las células por 4 h para que formaran cristales de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales. Luego, 100 µL de buffer de solubilización (10% Triton X-100, 0.1 N HCl in isopropanol) fue añadido a cada pocillo e incubado a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> por 18 h para disolver los cristales de formazán, y la cantidad de formazán convertida por las células viables fue determinada mediante absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos. Los resultados se normalizan a células no tratadas (100%) y se expresaron como el promedio ± error estándar de la media de triplicados para obtener el porcentaje de viabilidad celular calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Viabilidad celular} = (\text{Abs}_{\text{promedio de muestra}} / \text{Abs}_{\text{promedio control}}) \times 100$$

## **CAPITULO IV. RESULTADOS**

## IV.1. Síntesis y caracterización de los nanogeles sintetizados

### IV.1.1. Síntesis de nanogeles

En la reacción de síntesis de nanogeles mediante el método de polimerización en emulsión se obtuvo una solución blanquecina azulada, opaca y turbia. Se realizaron varias reacciones de las dos formulaciones a continuación se muestran en la siguiente tabla algunos resultados del diámetro hidrodinámico (Dh) de los nanogeles en muestras crudas con su respectivo índice de polidispersidad (Pdi).

**Tabla 4.** Índice de polidispersidad y Diámetro hidrodinámico de los nanogeles sintetizados.

Rxn	Dh (nm)	Pdi
CAM10-BAAC 1	151.2	0.003
CAM10-BAAC 2	152.6	0.009
CAM10-BAAC 3	134.5	0.003
CAM10-EGDMA 1	179.3	0.203
CAM10-EGDMA 2	173.9	0.206

Los resultados en la tabla muestran un Dh menor a 200 nm en todas las reacciones y un PDI menor a 1.

#### IV.1.2. Diámetro hidrodinámico y potencial zeta

A los nanogeles sintetizados se les realizaron pruebas de caracterización. Una de ellas fue medir el efecto del tamaño del diámetro hidrodinámico a diferentes valores de pH.

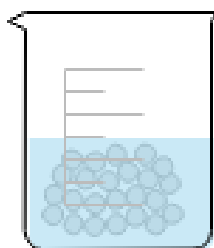


Figura 1. Nanogeles distribución en agua.

**Tabla 5.** Nano partículas de CAM10-PEGMAM-BAAC a diferentes pH.

pH	Potencial Z	Dh	pdi
1.2	-0.0998	184 nm	0.178
6.8	0.132	183.5 nm	0.202
7.4	0.0223	196.9 nm	0.241
H <sub>2</sub> O	-31.9	152 nm	0.046

En los nanogeles CAM10-PEGMAM-BAAC tratados con BFF pH 1.2 y agua se observó un Potencial Z negativo, y Potenciales Z positivos para los nanogeles tratados con pH 6.8 Y 7.4, los tamaños de los nanogeles aumentaron de 150nm a 180nm en promedio al exponerlos en los diferentes

pH, pero no su tamaño sigue siendo menor a 200 nm y pdi menor a 1, así que no es una diferencia significativa.

**Tabla 6.** Nano partículas de CAM10-PEGMAM-EGDMA a diferentes pH.

pH	Potencial Z	Dh	pdi
1.2	-0.882	184.5	0.276
6.8	-4.89	132.6	0.049
7.4	-7.95	136.6	0.063
H <sub>2</sub> O	-25.8	175.3	0.205

En cambio, en los nanogeles CAM10-PEGMAM-EGDMA se observaron potenciales z negativos en los diferentes BFF's y en agua y su tamaño sigue siendo menor a 200 nm y PDI menor a 1.

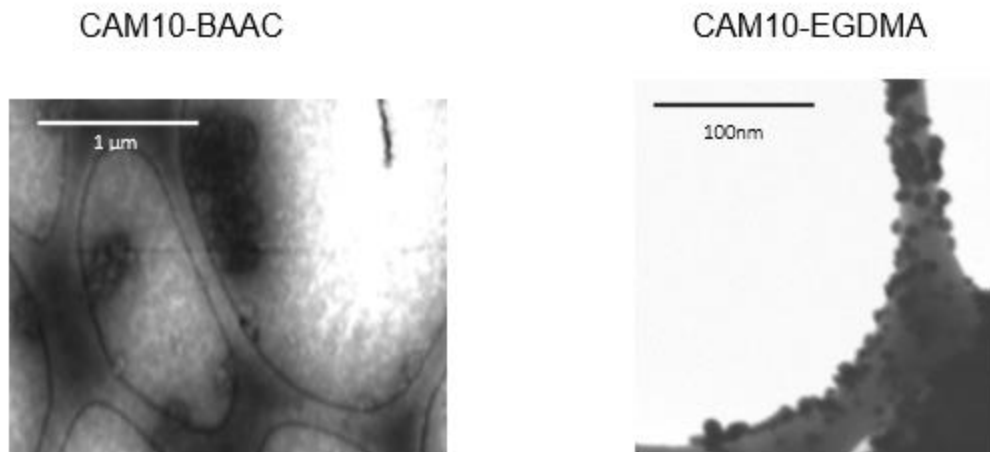
**Tabla 7.** Nano partículas liofilizadas y reconstituidas.

	pH	Potencial z	Dh	Pdi
CAM10-PEGMAM-BAAC	7.4	-12.5 mV	165.1nm	0.028
CAM10-PEGMAM-EGDMA	7.4	-9.94 mV	504.8nm	0.537

Curiosamente al liofilizar y reconstituir los nanogeles CAM10-PEGMAM-EGDMA su potencial z cambio de positivo a negativo y en su tamaño aumentaron hasta los 500nm al parecer se aglomeraron en el proceso.

#### IV.2. Microscopia FESEM

Los estudios morfológicos de los nanogeles se caracterizaron mediante Microscopia FESEM. En la figura 2 se muestra el resultado obtenido en donde se encontró que los nanogeles presentaron una morfología con estructura esférica como se esperaba.



**Figura 2:** Imágenes de microscopia FESEM.

### IV.3. Capacidad carga y Eficiencia de carga de fármacos

Los experimentos para incorporar los fármacos modelos a los nanogeles, entrecruzados con EGDMA y entrecruzados con BAAC, se realizaron variando las condiciones como la temperatura de equilibrio, la temperatura de recuperación y el medio de cargado. Para cuantificar la cantidad de fármaco cargado, se utilizaron los cálculos mostrados en los ANEXOS 4 y 5, con los cuales se obtiene el porcentaje de carga y la eficiencia.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del cargado de CUR, de acuerdo con los cálculos utilizados en el Anexo 5 y la curva de calibración obtenida por Espectrofotometría (ANEXO 2).

**Tabla 8.** Resultados de la Capacidad carga y Eficiencia de carga de CUR.

Nanogeles reconstituidos y fármaco	mg utilizados de nanogeles	mg utilizados de fármaco	Peso del liofilizado cargado	ABS	% Capacidad de carga	% Eficiencia de carga
EGDMA, PEGMAN+CUR	123	30	78.2	0.724	18.06	47.07
BAAC, PEGMAN +CUR	70	20	33	0.741	27.83	45.91

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos del cargado de 5-FU, de acuerdo con los cálculos utilizados en el Anexo 5 y la curva de calibración obtenida por Espectrofotometría (ANEXO 3).

**Tabla 9.** Resultados de Capacidad carga y Eficiencia de carga de 5-FU.

Nanogeles reconstituidos y fármaco	mg utilizados de nanogeles	mg utilizados de fármaco	Peso del liofilizado cargado	ABS	% Capacidad de carga	% Eficiencia de carga
EGDMA+5FU	123	20	55.8	0.707	14.55	40.59
BAAC+5FU	70	20	25.5	0.177	16.56	21.14

#### IV.4. Hidrólisis de nanogeles a diferentes pH

Se realizaron estudios de hidrólisis de nano partículas reticuladas con BAAC a diferentes concentraciones de GSH y diferentes pH para comprobar su respuesta redox en condiciones de biodegradación mediante DLS controlando el cambio de tamaño de las nanoparticulas con las diferentes concentraciones de GSH, (2,4,6.8 y 10  $\mu$ M a 37°C).

##### IV.4.1. Hidrólisis de nanogeles a pH 7.4

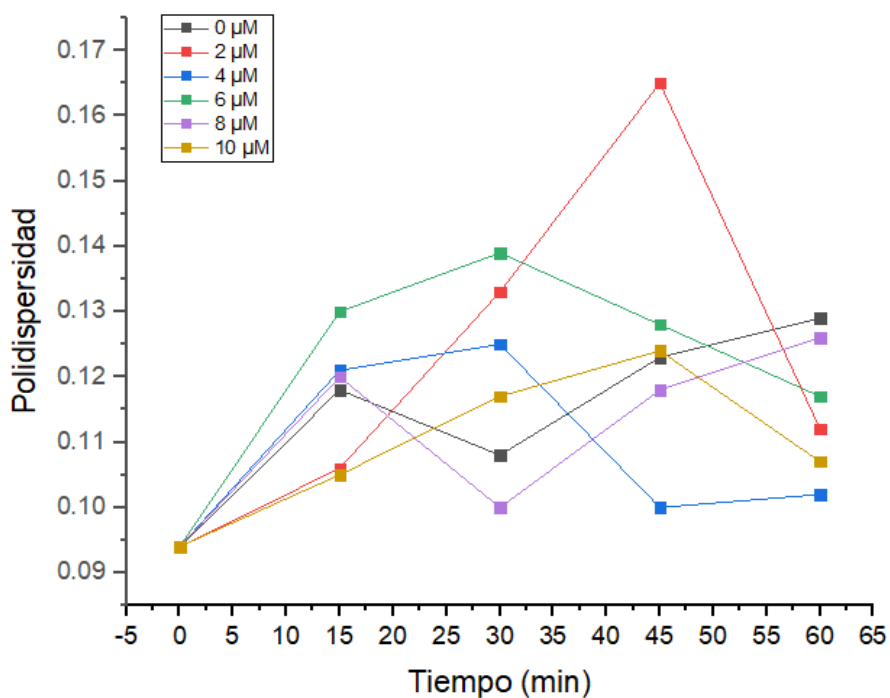
Se tomaron muestras cada 15 minutos y se midió el diámetro hidrodinámico (Dh) e índice de polidispersidad (PDI) vía DLS, la siguiente tabla nos muestra los resultados obtenidos, en la tabla nos indica que en media hora los nanogeles

tratados con 8 y 10  $\mu\text{M}$  de glutatión muestran tamaños más pequeños y pdi mas grandes los que nos indican que ya están hidrolizados.

**Tabla 10.** Resultados de Hidrolisis de nanogeles a pH 7.4

TIEMPOS DE MUESTREO	Sin glutatión		2 $\mu\text{M}$		4 $\mu\text{M}$		6 $\mu\text{M}$		8 $\mu\text{M}$		10 $\mu\text{M}$	
	Dh	pdi	Dh	pdi	Dh	pdi	Dh	pdi	Dh	pdi	Dh	pdi
<b>0</b>	197.2	0.094	197.2	0.094	197.2	0.094	197.2	0.094	197.2	0.094	197.2	0.094
<b>15</b>	174	0.118	175.6	0.106	170.1	0.121	180.5	0.130	167.17	0.120	169.2	0.105
<b>30</b>	178.2	0.108	176.8	0.133	172	0.125	181.5	0.139	167.7	0.100	169.8	0.117
<b>45</b>	178.7	0.123	181.5	0.165	170.2	0.100	182.7	0.128	168.0	0.118	167.3	0.124
<b>60</b>	179.2	0.129	176.8	0.112	170.08	0.102	182.9	0.117	169.2	0.126	169	0.107

### Hidrólisis de nanogeles pH 7.4 a diferentes tiempos



**Figura 3:** Hidrólisis de nanogeles a pH 7.4

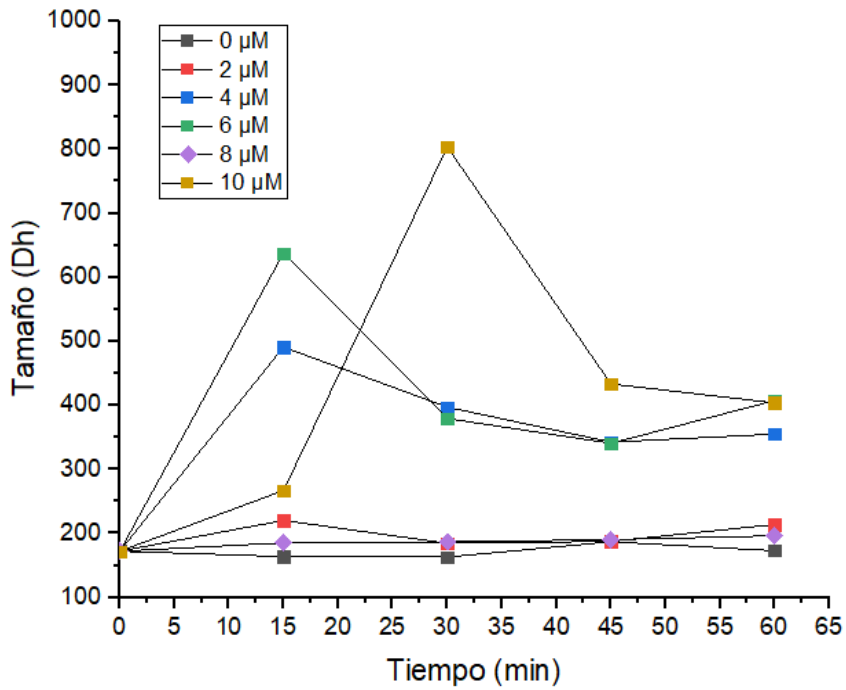
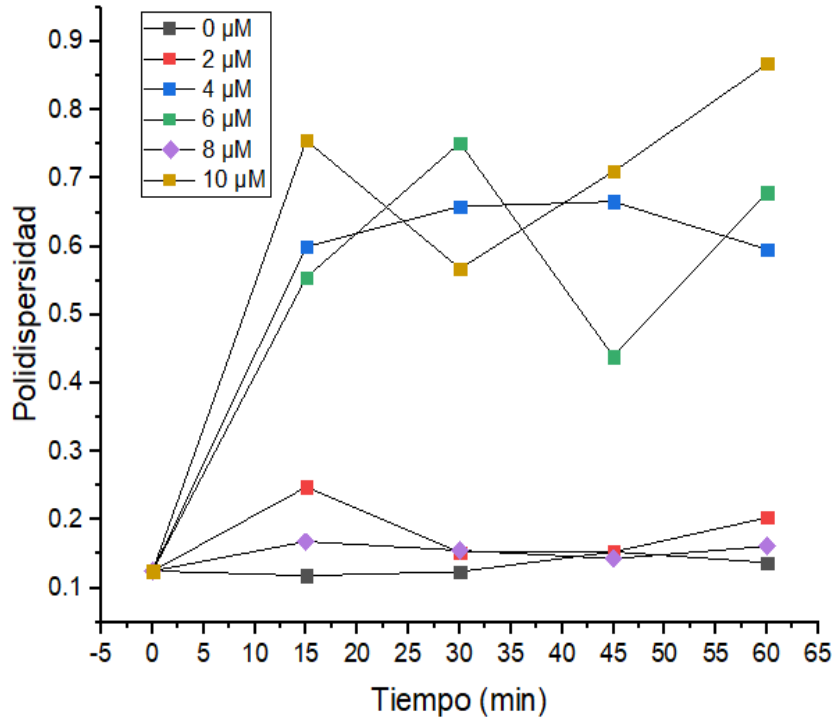
#### IV.4.2. Hidrólisis de nanogeles a pH 6.8

Se tomaron muestras cada 15 minutos y se midió el diámetro hidrodinámico (Dh) e índice de polidispersidad (pdi) vía DLS, la siguiente tabla nos muestra los resultados obtenidos, en la tabla nos indica que en media hora los nanogeles tratados con glutatión muestran cambios en los tamaños con respecto al tiempo y pdi mas grandes, lo que nos indica que están hidrolizados.

**Tabla 11.** Resultados de Hidrólisis de nanogeles a pH 6.8.

TIEMPOS DE MUESTREO	Sin glutación		2 $\mu$ M		4 $\mu$ M		6 $\mu$ M		8 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi
<b>0</b>	172.2	0.125	172.2	0.125	172.2	0.125	172.2	0.125	172.2	0.125	172.2	0.125
<b>15</b>	163.6	0.118	220.3	0.248	491.1	0.600	637.6	0.555	185.4	0.168	266.9	0.756
<b>30</b>	162.9	0.124	184.6	0.152	397.2	0.659	379.4	0.752	186.8	0.155	803.7	0.568
<b>45</b>	186.9	0.153	187.3	0.153	342.5	0.666	340.7	0.439	190.3	0.143	433.5	0.71
<b>60</b>	172.9	0.137	213.8	0.203	355	0.596	407.5	0.679	196.2	0.161	403.9	0.868

**Hidrólisis de nanogeles pH 6.8 a diferentes tiempos**



**Figura 4:** Hidrolisis de nanogeles a pH 6.8.

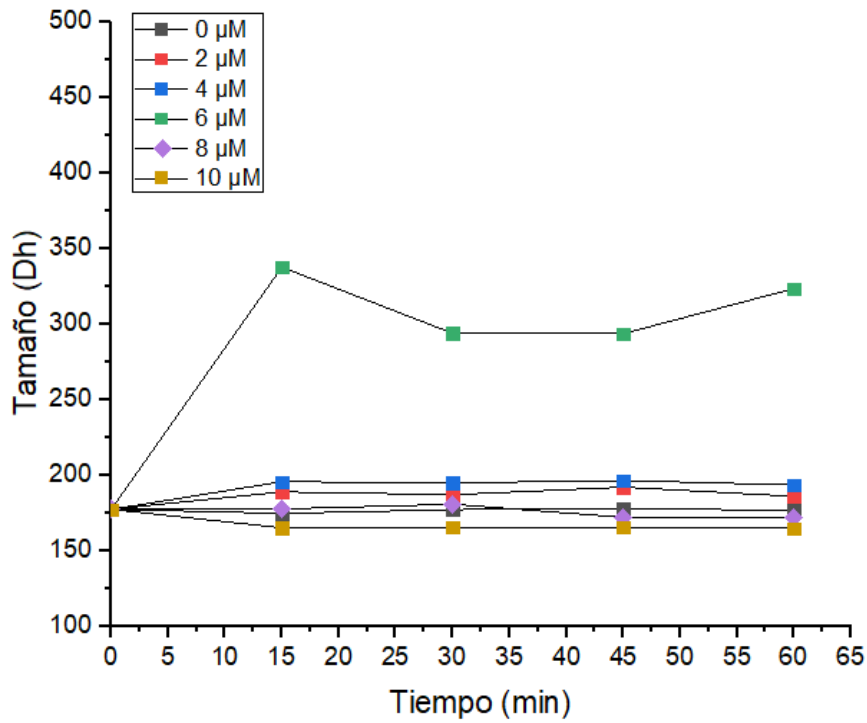
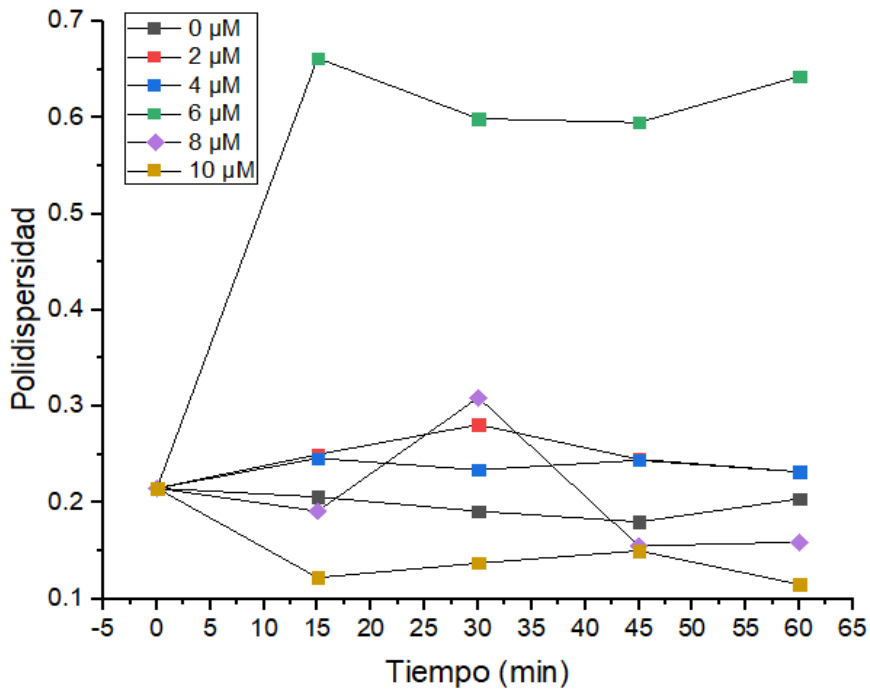
#### IV.4.3. Hidrólisis de nanogeles a pH 1.2

Se tomaron muestras cada 15 minutos y se midió el diámetro hidrodinámico (Dh) e índice de polidispersidad (pdi) vía DLS, la siguiente tabla nos muestra los resultados obtenidos, en la tabla nos indica que los nanogeles tratados con pH 1.2 muestran tamaños irregulares y cambia su pdi.

**Tabla 12.** Resultados de Hidrolisis de nanogeles a pH 1.2.

TIEMPOS DE MUESTREO	Sin glutación		2 $\mu$ M		4 $\mu$ M		6 $\mu$ M		8 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
	Minutos	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh	Pdi	Dh
0	177.2	0.215	177.2	0.215	177.2	0.215	177.2	0.215	177.2	0.215	177.2	0.215
15	174.5	0.206	188.8	0.250	195.5	0.246	337.6	0.662	177.4	0.191	165	0.122
30	177	0.191	187	0.281	194.8	0.234	293.8	0.599	180.6	0.309	165.4	0.137
45	178	0.180	191.9	0.245	196.3	0.244	293.6	0.595	171.9	0.155	165.6	0.150
60	176.3	0.204	185.8	0.232	193.4	0.232	323.5	0.643	171.9	0.159	164.8	0.115

#### Hidrólisis de nanogeles pH 1.2 a diferentes tiempos



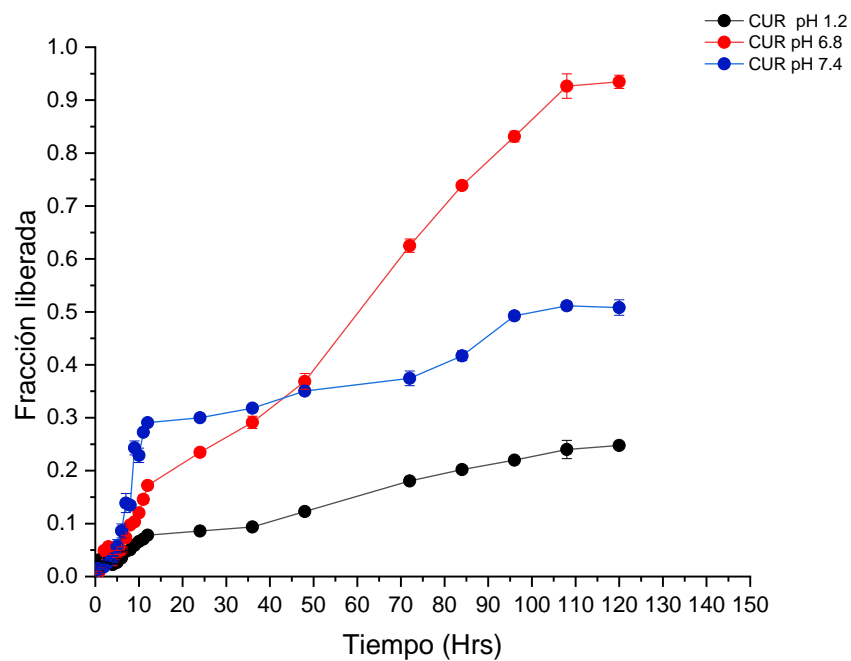
**Figura 5:** Hidrolisis de nanogeles a pH 1.2

#### IV.5. Liberaciones de fármacos a diferentes pH

Se realizaron estudios de liberación se llevó a cabo mediante la utilización de membranas de diálisis y agitación constante de Cur libre y Cur cargada en los nanogeles sintetizados con diferentes reticulantes BAAC Y EGDMA, (CUR-BAAC y CUR-EGDMA) por triplicado a 37°C por 120 horas para obtener la cinética de liberación de curcumina, igualmente para 5-fluorouracilo se realizaron estudios de liberación de 5-FU libre y 5-FU cargado en los nanogeles sintetizados con diferentes reticulantes BAAC Y EGDMA, (5-FU-BAAC y 5-FU-EGDMA) por 36 horas evaluando el efecto del pH. Para cuantificar la cantidad de fármaco liberado, se utilizaron curvas de calibración (ANEXOS 6 y7). previas al experimento para obtener la fracción liberada con respecto al tiempo.

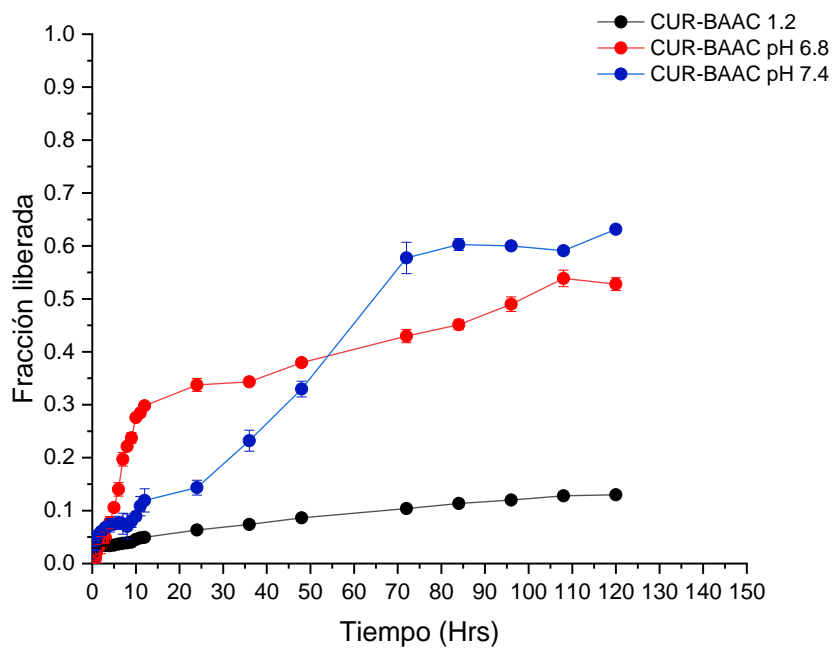
#### **IV.5.1. Resultados de liberaciones de CUR**

Los resultados se muestran como la fracción liberada (FL) de CUR a pH (1.2, 6.8 y 7.4), en la Figura 6 se muestra la comparación de las 3 cinéticas estudiadas, en la que se logra captar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 6.8.



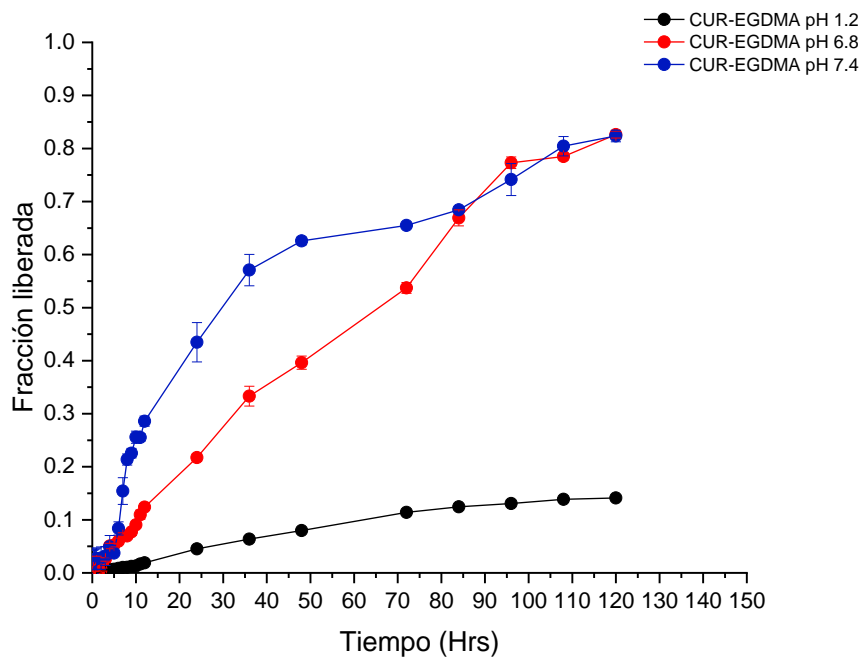
**Figura 6.** Cinética de liberación de CUR a diferentes pH durante 120 horas a 37°C.

Estos resultados son congruentes con lo esperado, ya que en condiciones ácidas como en el estómago la liberación es menor y se protege la degradación de la CUR, mientras que a pH colónico (4.5-7.5) la liberación observada es mayor.



**Figura 7.** Cinética de liberación de CUR-BAAC a diferentes pH a partir de nanogel reticulados con BAAC y cargados con CUR.

Los resultados se muestran como la fracción liberada (FL) de CUR-BAAC a pH (1.2,6.8 y 7.4), en la Figura 7, en donde podemos observar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 7.4.

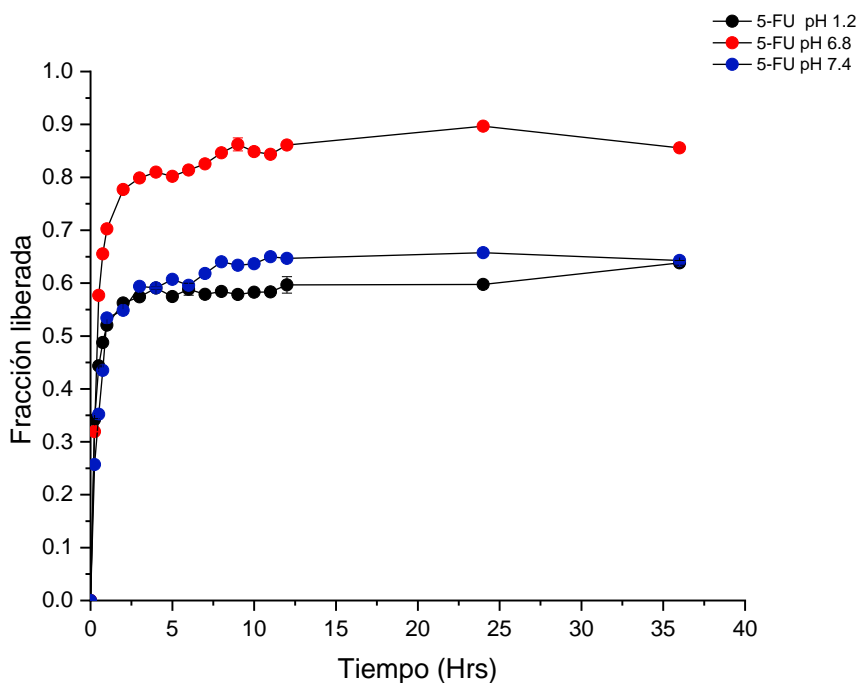


**Figura 8.** Cinética de liberación de CUR-EGDMA a diferentes pH a partir de los nanogeles reticulados con EGDMA y cargados con CUR.

Los resultados se muestran como la fracción liberada (FL) de CUR-EGDMA a pH (1.2,6.8 y 7.4), en la Figura 8, en donde podemos observar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 7.4 Y 6.8.

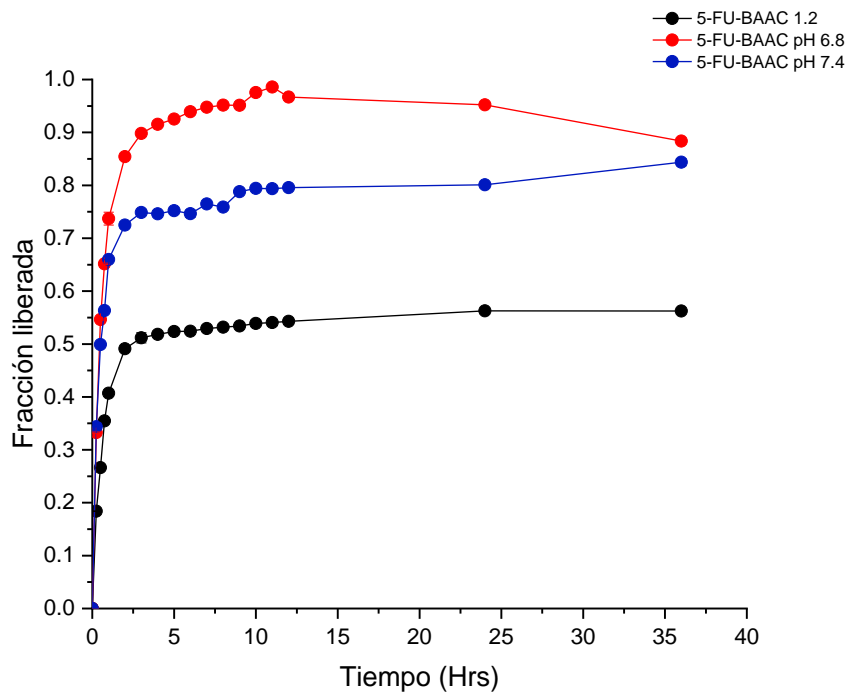
#### IV.5.2. Resultados de liberaciones de 5-FU

La liberación de 5-FU se llevó a cabo mediante la utilización de membranas de diálisis, usando de medio buffer de pH 1.2, 6.8 y 7.4, dejándose en agitación constante con temperatura controlada (a 37°), tomándose muestras en los tiempos previamente establecidos (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2, 3, 4, 5,6,7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 y 36 h). La gráfica muestra los resultados obtenidos en la liberación.



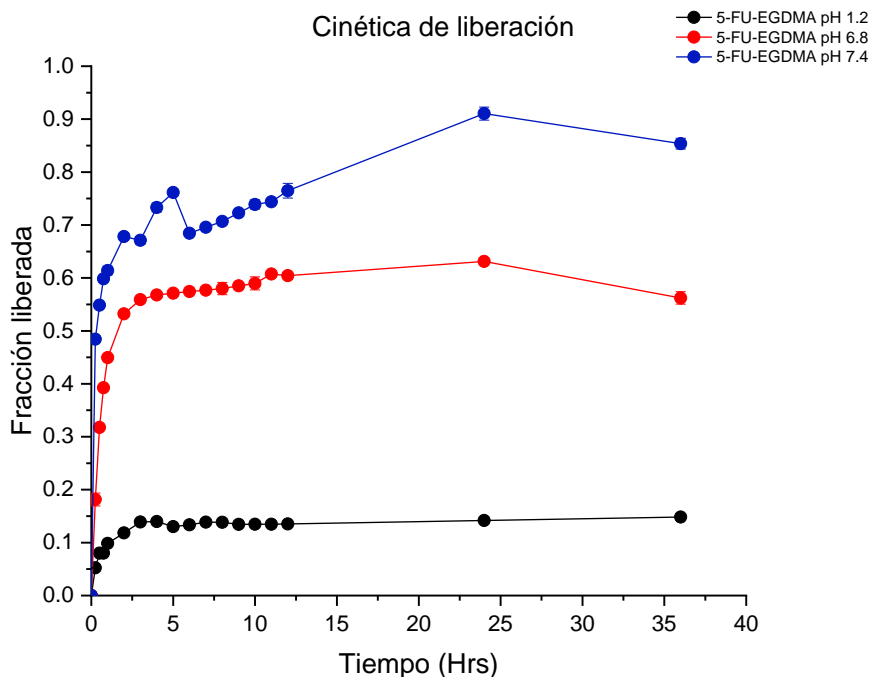
**Figura 9.** Cinética de liberación de 5-FU en diferentes pH a 37° C.

Los resultados se muestran como la fracción liberada de 5-FU, en la Figura 9, en donde podemos observar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 7.4 y 6.8.



**Figura 10.** Cinética de liberación de 5-FU-BAAC a diferentes pH a partir de los nanogeles cargados a 37°C.

Los resultados se muestran como la fracción liberada de 5-FU-BAAC, en la Figura 10, en donde podemos observar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 7.4 y 6.8.



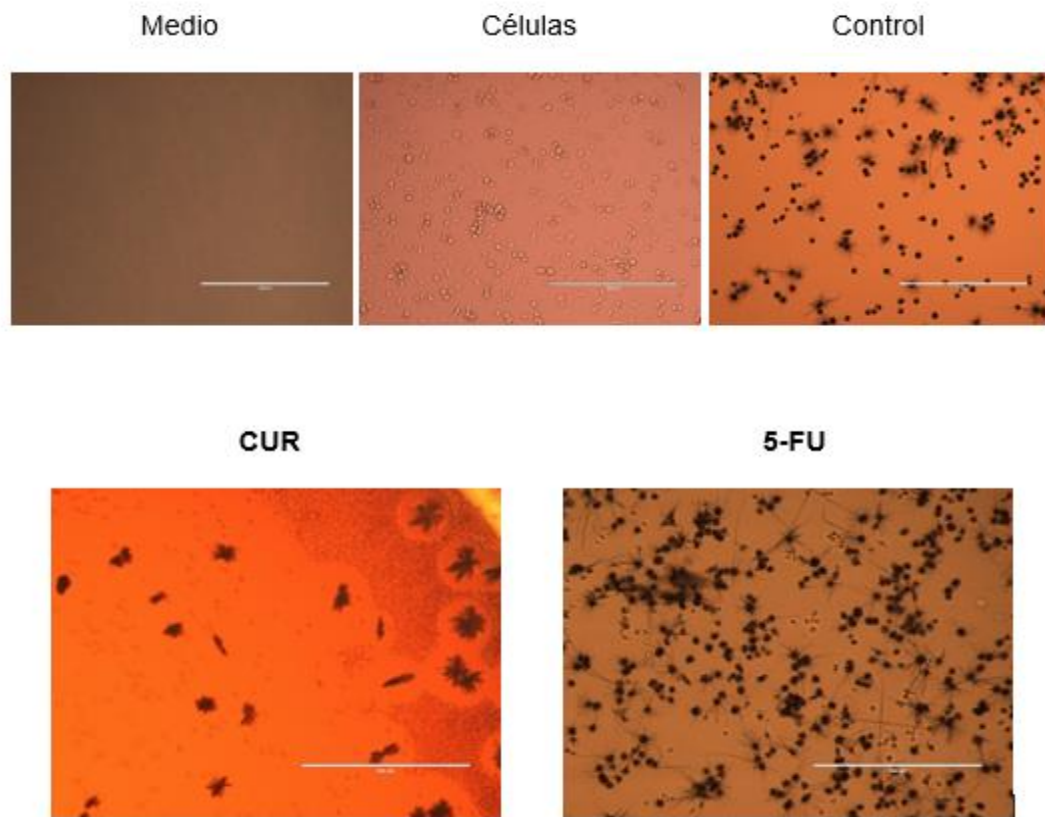
**Figura 11.** Cinética de liberación de 5-FU-EGDMA a diferentes pH a partir de los nanogeles cargados a 37°C.

Los resultados se muestran como la fracción liberada de 5-FU-EGDMA, en la Figura 11, en donde podemos observar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 7.4.

#### **IV.6. Estudio de citotoxicidad en fibroblastos de los nanogeles cargados por el método de MTT**

Se midió la citotoxicidad de los nanogeles cargados por el método de MTT y se comparó con los fármacos libres en una línea celular de fibroblastos. Para determinar la biocompatibilidad de los materiales.

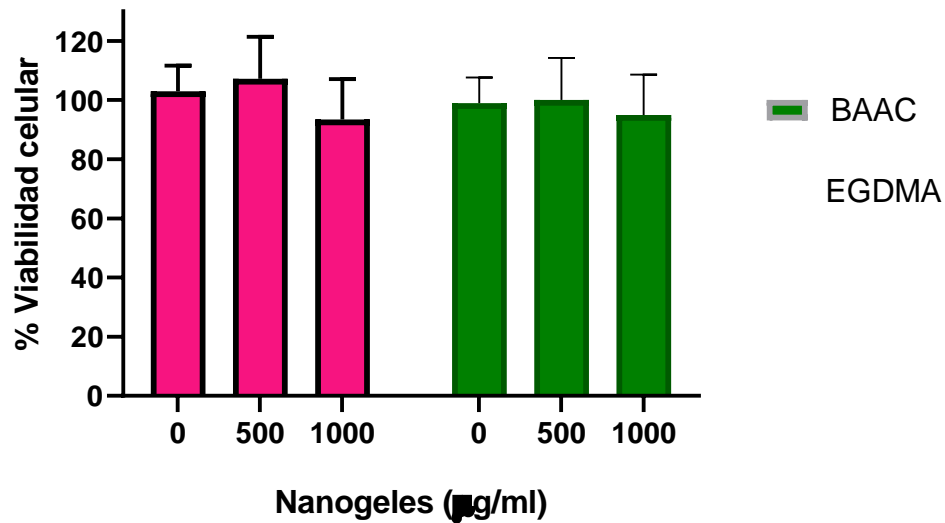
Este es un método simple en el que el MTT es captado y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble de color morado, formazán. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular; además, permite obtener información acerca de la citotoxicidad del compuesto que se evalúa. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado en el proceso (Puértolas Soto L., 2015).



**Figura 12.** Imágenes de células tratadas con nanogeles cargados con CUR y 5-FU por el método de MTT obtenidas de FLoid™ Cell Imaging Station.

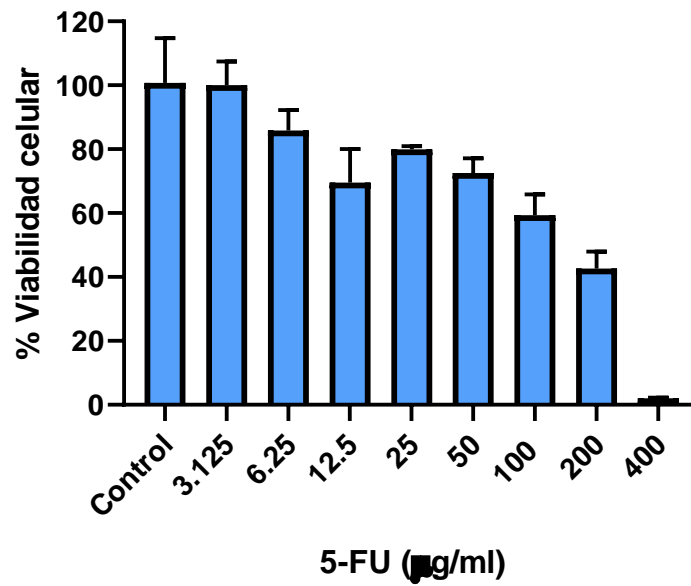
## Viabilidad celular de los fármacos estudiados

Para este estudio se espera que el 5-FU sea tóxico para que pueda producirse la apoptosis celular en las células cancerosas y la CUR se espera que no sea tóxica ya que su función es actuar como una molécula reparadora de las células afectadas.



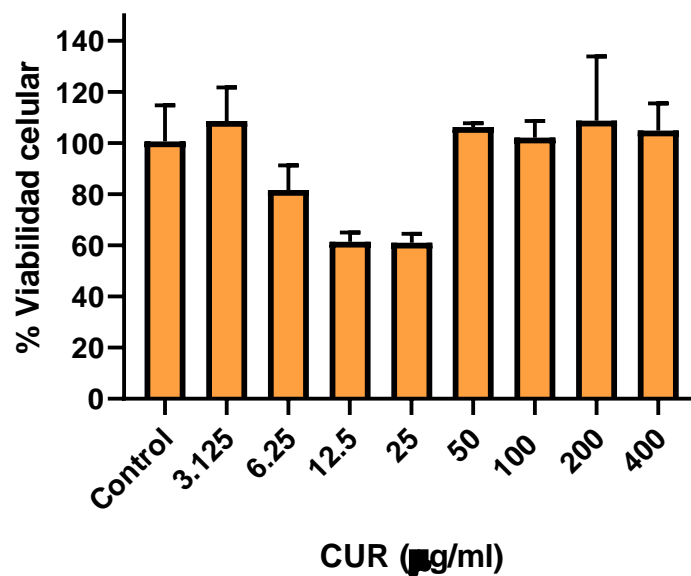
**Figura 13.** Viabilidad celular de nanogeles CUR y EGDMA.

En la Figura 13, se puede observar que los nanogeles por sí solos reticulados con BAAC y con EGDMA no son tóxicos para las células.



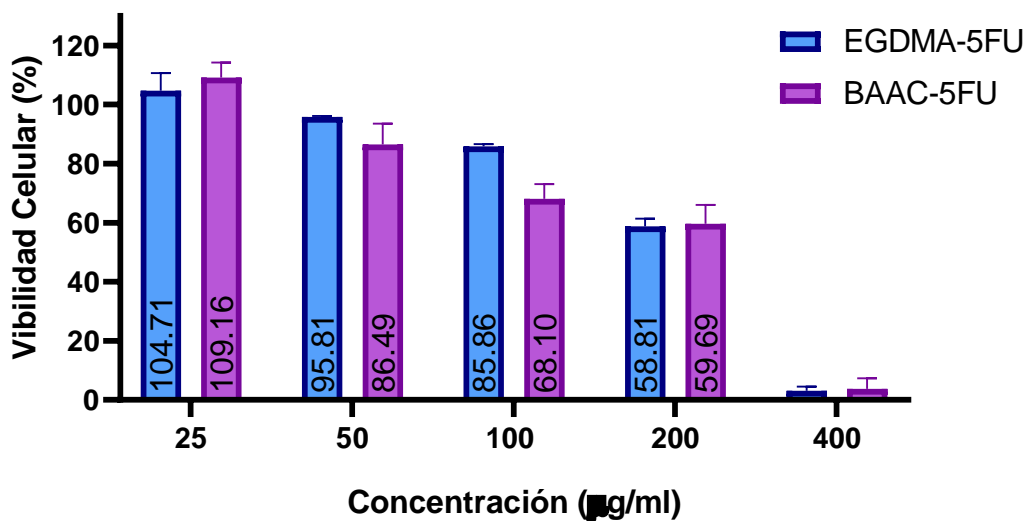
**Figura 14.** Viabilidad celular de 5-FU.

En la Figura 14, se puede observar que el 5-FU libre por si solo es toxico a la concentración de 400 µg/ml que es lo esperado ya que se requiere que sea toxico para que pueda generar apoptosis en células cancerosas, conforme va bajando la dosis su toxicidad va disminuyendo.



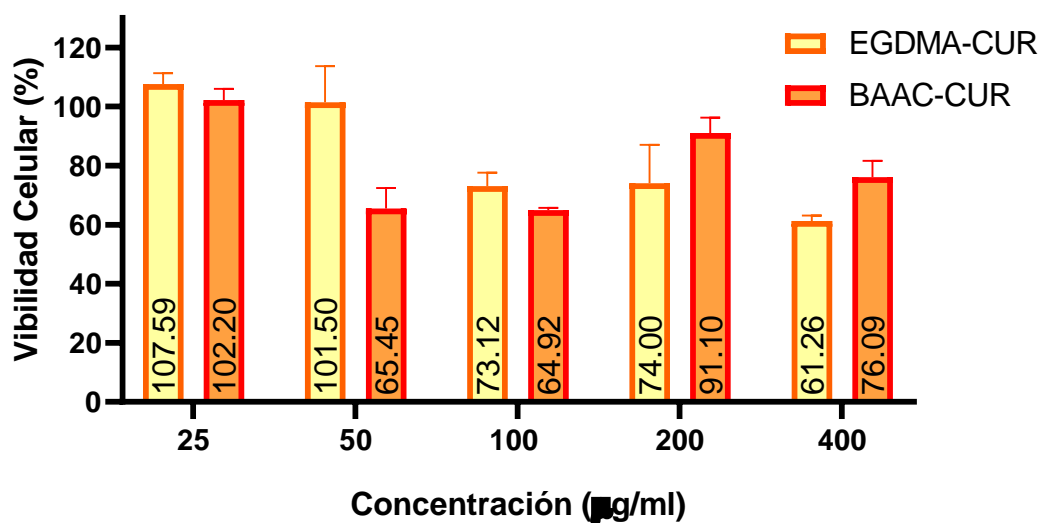
**Figura 15.** Viabilidad celular de CUR.

En la Figura 15, se puede observar que la CUR libre no es toxica a ninguna concentración, su % de viabilidad esta casi al 100% en la mayoría de las dosis que es lo esperado ya que se requiere que no sea toxica.



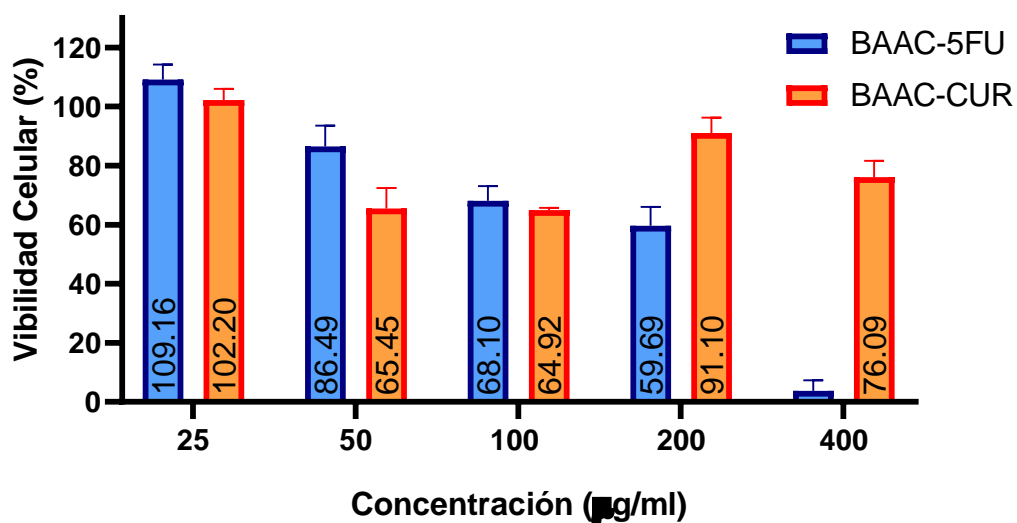
**Figura 16.** Viabilidad celular de las formulaciones cargadas con 5-FU.

En la Figura 16, se puede observar que las nanoparticulas reticuladas con BAAC y EGDMA y Cargadas con 5-FU resultan toxicas en ambas formulaciones a la concentración mas alta 400 µg/ml lo que resulta favorable para este proyecto y su toxicidad empieza a disminuir conforme se va reduciendo la concentración de fármaco añadido.



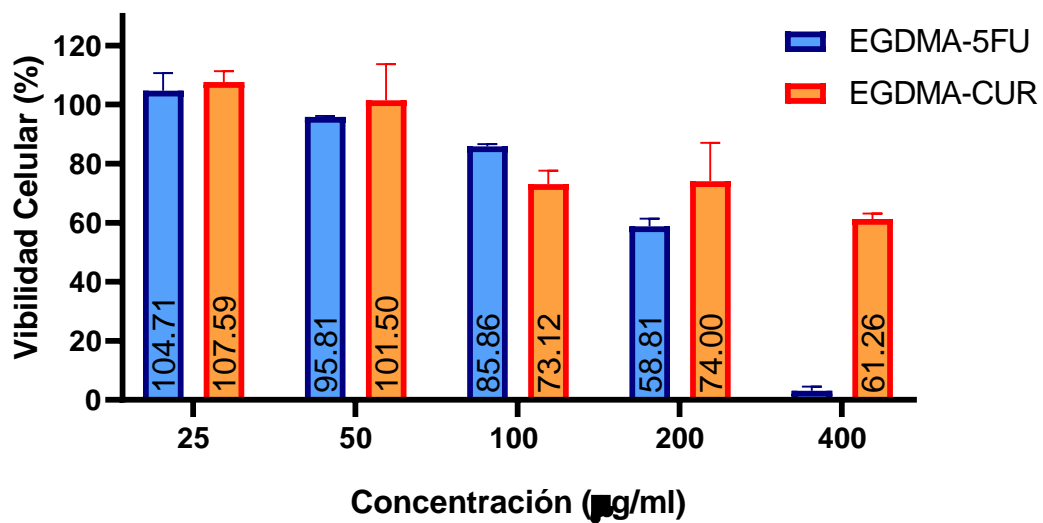
**Figura 17.** Viabilidad celular de las formulaciones cargadas con CUR.

En la Figura 17, se puede observar que las nanoparticulas reticuladas con EGDMA y cargadas con CUR son menos toxicas que las nanoparticulas reticuladas con BAAC y cargadas con CUR a concentraciones más altas ya que se muestra un % de viabilidad celular más alto para los nanogeles reticulados con BAAC.



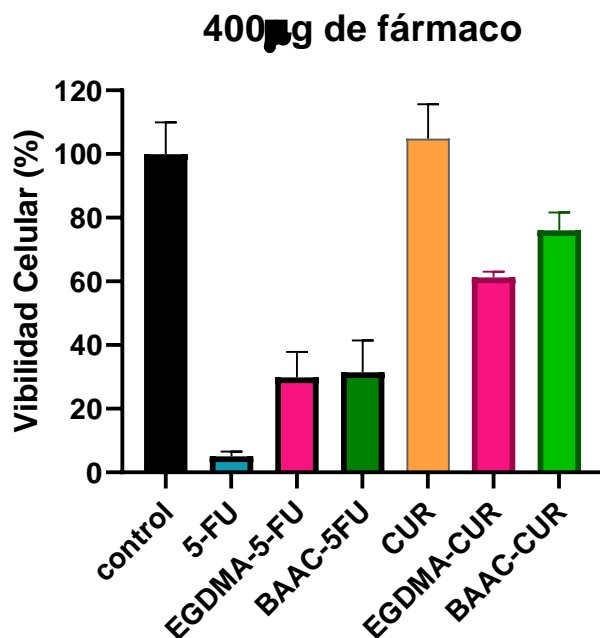
**Figura 18.** Viabilidad celular de las formulaciones de BAAC.

En la Figura 18, se puede observar que la formulación de nanopartículas reticuladas con BAAC son favorables para ambos fármacos ya que mantiene sus propiedades.



**Figura 19.** Viabilidad celular de las formulaciones de EGDMA.

En la Figura 19, se puede observar que la formulación de nanopartículas reticulada con EGDMA es favorable para ambos fármacos.



**Figura 20.** Viabilidad celular de los diferentes grupos a 400 µg/ ml.

En la Figura 20, se puede observar que 5- FU solo o cargado en cualquiera de las dos formulaciones (BAAC, EGDMA) sigue siendo toxico a concentracion de 400 µg de fármaco, al igual que CUR mantiene sus propiedades ya sea sola o cargada en cualquiera de las dos formulaciones en la gráfica se muestra que CUR no es toxica.

## **CAPITULO V. CONCLUSIONES**

Se sintetizaron nanogeles de CAM10/EGDMA y CAM10/BAAC mediante polimerización en emulsión sin detergente con metacrilato de polietilenglicol (PEGMAM). El método de síntesis es rápido y eficiente para llevar a cabo la síntesis de los nanogeles, los cuales muestran una sensibilidad al pH debido a que en diferentes pH exhiben un cambio de tamaño y mostraron una respuesta favorable al ser analizados. Se caracterizaron los nanogeles vía dispersión de luz dinámica (DLS) se determinó el tamaño, número de distribuciones y diámetro hidrodinámico de cada síntesis, se observó la morfología y el tamaño de las nanopartículas por Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), Se cargaron los nanogeles con CUR y 5-FU, se determinó la capacidad de carga y eficiencia de carga de las nanopartículas se obtuvieron estudios de cinética de liberación de curcumina y 5-fluorouracilo evaluando el efecto del pH , se midió la citotoxicidad de los nanogeles cargados por el método de MTT y con los fármacos libres en una línea celular de fibroblastos y se realizaron estudios de hidrólisis de nano partículas con GSH a diferentes concentraciones para comprobar su respuesta redox en condiciones de biodegradación.

Los nanogeles de CAM10/EGDMA y CAM10/BAAC mostraron forma esférica y diámetros hidrodinámicos menores de 200 nm capaces de cargar y liberar CUR y 5-FU. Las nanopartículas en contacto con una línea celular de fibroblastos (células sanas) mostraron resultados de citotoxicidad positiva para los nanogeles cargados con 5-fu y toxicidad nula para los nanogeles cargados con CUR ,se esperaba que no sea toxica ya que su función es actuar como una molécula reparadora de las

células afectadas, varios estudios han demostrado que la curcumina puede inducir la apoptosis y la detención del ciclo celular en muchas líneas celulares de cáncer de colon (Wu et al. 2020).

Como trabajo futuro las nanopartículas podrían ser probadas en líneas celulares de cáncer de colon para evaluar su citotoxicidad en células a las que van dirigidas las nano partículas cargadas con CUR y 5-FU.

## **CAPITULO VI. REFERENCIAS**

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Amidon, S., Brown, J. E., & Dave, V. S. (2015). Colon-Targeted Oral Drug Delivery Systems: Design Trends and Approaches. *AAPS PharmSciTech*, 16(4), 731–741. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0350-9>
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., & De Gramont, A. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2343–2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>
- Anita, Singh, A., & Ankit, D. (2019). A review on colon targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(01), 47–56. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(1\).47-56](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(1).47-56)
- Anitha, A., Maya, S., Sivaram, A. J., Mony, U., & Jayakumar, R. (2016). Combinatorial nanomedicines for colon cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(1), 151–159. <https://doi.org/10.1002/wnan.1353>
- Arem, H., & Lofffield, E. (2018). Cancer Epidemiology: A Survey of Modifiable Risk Factors for Prevention and Survivorship. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 12(3), 200–210. <https://doi.org/10.1177/1559827617700600>

- Arévalo-Pérez, R., Maderuelo, C., & Lanao, J. M. (2020). Recent advances in colon drug delivery systems. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 327, pp. 703–724). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.026>
- Arias, J. L. (2008). Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*, 13(10), 2340–2369. <https://doi.org/10.3390/molecules13102340>
- Ashwanikumar, N., Asok Kumar, N., Asha Nair, S., Vinod Kumar, G., Kumar Chemical Biology, V., & Gandhi, R. (2012). Methacrylic-based nanogels for the pH-sensitive delivery of 5-Fluorouracil in the colon. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5769–5779. <https://doi.org/10.2147/IJN.S31201>
- Azizi, E., Namazi, A., Haririan, I., Fouladdel, S., Khoshayand, M. R., Shotorbani, P. Y., Nomani, A., & Gazori, T. (2010). Release profile and stability evaluation of optimized chitosan/alginate nanoparticles as EGFR antisense vector. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 455–461. <https://doi.org/10.2147/ijn.s9551>
- Banerjee, A., Pathak, S., Subramaniam, V. D., Dharanivasan, G., Murugesan, R., & Verma, R. S. (2017). Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. In *Drug Discovery Today* (Vol. 22, Issue 8, pp. 1224–1232). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.006>
- Bastos, D., De las Nieves, F.; *J. Colloid Polym. Sci.* 1996, 274,1081.
- Benito-Miguel, M., Blanco, M. D., & Gómez, C. (2015). Assessment of sequential combination of 5-fluorouracil-loaded-chitosan-nanoparticles and ALA-photodynamic therapy on HeLa cell line. *Photodiagnosis and Photodynamic*

*Therapy*, 12(3), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.05.001>

Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020).

5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Science*, 111(9), 3142–3154. <https://doi.org/10.1111/cas.14532>

Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 24–36.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>

Calero, M. C. (2015). *Caracterización de nanopartículas magnéticas en cultivos celulares para sus aplicaciones biomédicas cellular studies of magnetic nanoparticles for biomedical applications.*

Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. In *Gastroenterology Clinics of North America* (Vol. 37, Issue 1, pp. 1–24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>

Chacko, R. T., Ventura, J., Zhuang, J., & Thayumanavan, S. (2012). Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 836–851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.02.002>

Chaturvedi, V. K., Singh, A., Singh, V. K., & Singh, M. P. (2018). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Drug Metabolism*, 20(6), 416–429. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180918111528>

Cheng, H., Huang, S., & Huang, G. (2019). Design and application of oral colon administration system. In *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Vol. 34, Issue 1, pp. 1590–1596). Taylor and Francis Ltd.

<https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1655406>

- Chivere, V. T., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., & Pillay, V. (2020). Nanotechnology-based biopolymeric oral delivery platforms for advanced cancer treatment. *Cancers*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/cancers12020522>
- Cornejo-Bravo, J. M., Becerra, C. D., Palomino, K., Magaña, H., Rivero, I., López-Maldonado, E., & Serrano-Medina, A. (2021). Copolymeric nano/microgels of N-isopropylacrylamide and carboxyalkyl methacrylamides: Effect of methylene chains and the ionization state of the weak acids on size and sensitivity to pH and temperature. *Soft Materials*, *19*(1), 89–99. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2020.1769130>
- Cuggino, J. C., Molina, M., Wedepohl, S., Igarzabal, C. I. A., Calderón, M., & Gugliotta, L. M. (2016). Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems. *European Polymer Journal*, *78*, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.02.022>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, *394*(10207), 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Diasio, R. B., & Harris, B. E. (1989). Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. In *Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 16, Issue 4, pp. 215–237). Clin Pharmacokinet. <https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002>
- Díaz-Cuadra, E. M. (2016). *Toxicidad aguda por 5-fluorouracilo durante el periodo de Abril a Diciembre del año 2016 en el Hospital Escuela Dr. Roberto Calderón Gutiérrez*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Eguino Villegas, Ana. Fernández Crespo, Ana Isabel. Fernández Sanchez, Belén.

- García Alvarez, Graciela. Pascual Fernández, C. (2002). Cáncer colorrectal Guía práctica. *Aecc*, 12, 9–18.
- Ehdaie, B. (2007). Application of nanotechnology in cancer research: Review of progress in the National Cancer Institute's alliance for nanotechnology. *International Journal of Biological Sciences*, 3(2), 108–110. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3.108>
- El-hoshoudy, A. N. M. B. (2018). Emulsion Polymerization Mechanism. In *Recent Research in Polymerization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72143>
- Fata, F., Ron, I. G., Kemeny, N., O'Reilly, E., Klimstra, D., & Kelsen, D. P. (1999). 5-Fluorouracil-induced small bowel toxicity in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 86(7), 1129–1134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19991001\)86:7<1129::AID-CNCR5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19991001)86:7<1129::AID-CNCR5>3.0.CO;2-4)
- Gao, Y., Xiao, X., Zhang, C., Yu, W., Guo, W., Zhang, Z., Li, Z., Feng, X., Hao, J., Zhang, K., Xiao, B., Chen, M., Huang, W., Xiong, S., Wu, X., & Deng, W. (2017). Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B/iNOS signaling pathways. In *Journal of Pineal Research* (Vol. 62, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/jpi.12380>
- García-Osogobio, S., Téllez-Ávila, F. I., Méndez, N., & Uribe-Esquivel, M. (2015). Results of the first program of colorectal cancer screening in Mexico. *Endoscopia*, 27(2), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.endomx.2015.06.001>
- García, J. F., & Hernández, C. F. (2016). Utilización de hidrogeles como liberadores de fármacos. *Convención Científica de Ingeniería y Arquitectura, February 2017*, 1–12. <https://www.researchgate.net/publication/311680954>
- García, M. C., & Cuggino, J. C. (2018a). Stimulus-responsive nanogels for drug

delivery. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 1: Types and Triggers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00016-3>

García, M. C., & Cuggino, J. C. (2018b). Stimulus-responsive nanogels for drug delivery. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 1: Types and Triggers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00016-3>

GLOBOCAN. (2018). *Cancer today*. International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)

GLOBOCAN. (2020). *Mexico: Globocan 2018*. International Agency for Research on Cancer-World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>

Gulbake, A., Jain, A., Jain, A., Jain, A., & Jain, S. K. (2016). Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 582–599). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.582>

Guler, Y., & Ovey, I. S. (2018). Synergic and comparative effect of 5-fluorouracil and leucovorin on breast and colon cancer cells through TRPM2 channels. *Bratislava Medical Journal*, 119(11), 692–700.

[https://doi.org/10.4149/BLL\\_2018\\_124](https://doi.org/10.4149/BLL_2018_124)

Hajebi, S., Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Ahmadi, S., Rabiee, M., Roghani-Mamaqani, H., Tahriri, M., Tayebi, L., & Hamblin, M. R. (2019). Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 92, pp. 1–18). Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.018>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., & Dorkoosh, F. A. (2020). PHBV/PLGA nanoparticles for enhanced delivery of 5-fluorouracil as promising treatment of colon cancer. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(2), 206–218. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1684945>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M., Angali, K. A., Saremy, S., & Dorkoosh, F. A. (2018a). A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108(July), 1259–1273. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.128>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M., Angali, K. A., Saremy, S., & Dorkoosh, F. A. (2018b). A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 1259–1273. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.128>

Hansova, B., Synek, S., & Opatrilova, R. (2011). 5-Fluorouracil – Characteristics and Analytical Determination. *Current Pharmaceutical Analysis*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.2174/157341211794708767>

Henmei, N., Yongzhong, D., Guanghui, M., Masatoshi, N., and Shinzo, O.;

- Mechanism of Soap-Free Emulsion Polymerization of Styrene and 4-Vinylpyridine: Characteristics of Reaction in the Monomer Phase, Aqueous Phase, and Their Interface. *Macromolecules*; 2001, 34, 6577-6585.
- Hernández-Olmos, S. L. (2014). Nanopartículas copoliméricas inteligentes ( pH – y T – sensibles ) y sus aplicaciones en biomedicina. *Tesis*, 1–4. [http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/saira\\_l.\\_hernandez.pdf](http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/saira_l._hernandez.pdf)
- Herrera, A., & Granados, M. (2013). *Manual de oncología* (5ta ed.). Procedimientos médicos quirúrgicos.
- HosseiniFar, T., Sheybani, S., Abdouss, M., Hassani Najafabadi, S. A., & Shafiee Ardestani, M. (2018). Pressure responsive nanogel base on Alginate-Cyclodextrin with enhanced apoptosis mechanism for colon cancer delivery. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 106(2), 349–359. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36242>
- Jabir, N. R., Tabrez, S., Ashraf, G. M., Shakil, S., Damanhour, G. A., & Kamal, M. A. (2012). Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4391–4408. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33838>
- Jaferian, S., Negahdari, B., & Eatemadi, A. (2016). Colon cancer targeting using conjugates biomaterial 5- fl urouracil. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 84, 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.004>
- Jenjob, R., Phakkeeree, T., Seidi, F., Theerasilp, M., & Crespy, D. (2019). Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*, 19(6), 1900063.

<https://doi.org/10.1002/mabi.201900063>

Ji, X., Peng, Q., & Wang, M. (2018). Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114(2017), 1127–1133.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.186>

Jung, H., Jang, M. K., Nan, J. W., & Kim, Y. B. (2009). Synthesis and characterization of thermosensitive nanoparticles based on PNIPAAm core and chitosan shell structure. *Macromolecular Research*, 17(4), 265–270.

<https://doi.org/10.1007/BF03218690>

Kesharwani, D., Mishra, S., Paul, S. Das, Paliwal, R., & Satapathy, T. (2019). The Functional Nanogel: An Exalted Carrier System. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 9, 570–582.

Khoee, S., & Asadi, H. (2016). Nanogels. Chemical Approaches to Preparation. In *Handbook of Encapsulation and Controlled Release* (1ra edició, pp. 1271–1299).

Krishnaiah, Y. S.R., Satyanarayana, V., Dinesh Kumar, B., & Karthikeyan, R. S. (2002). In vitro drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00081-7)

Krishnaiah, Yellela S.R., & Khan, M. A. (2012). Strategies of targeting oral drug delivery systems to the colon and their potential use for the treatment of colorectal cancer. In *Pharmaceutical Development and Technology* (Vol. 17, Issue 5, pp. 521–540). <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.696268>

Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., & Kawashima, Y. (2003). Microsphere

- design for the colonic delivery of 5-fluorouracil. *Journal of Controlled Release*, 90(3), 313–322. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00195-0)
- Lee, S. H., Bajracharya, R., Min, J. Y., Han, J. W., Park, B. J., & Han, H. K. (2020). Strategic approaches for colon targeted drug delivery: An overview of recent advancements. *Pharmaceutics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010068>
- Li, D., van Nostrum, C. F., Mastrobattista, E., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2017). Nanogels for intracellular delivery of biotherapeutics. *Journal of Controlled Release*, 259, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.020>
- Li, P., Yang, Z., Wang, Y., Peng, Z., Li, S., Kong, L., & Wang, Q. (2015). Microencapsulation of coupled folate and chitosan nanoparticles for targeted delivery of combination drugs to colon. *Journal of Microencapsulation*, 32(1), 40–45. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.944947>
- Li, X., Tsibouklis, J., Weng, T., Zhang, B., Yin, G., Feng, G., Cui, Y., Savina, I. N., Mikhalovska, L. I., Sandeman, S. R., Howel, C. A., & Mikhalovsky, S. V. (2017). Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, 25(1), 17–28. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1184272>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lovell, P. A., & Schork, F. J. (2020). Fundamentals of Emulsion Polymerization. *Biomacromolecules*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00769>
- Macrae, F. A., Goldberg, R. M., Seres, D., & Savarese, D. M. (2020, July 6). *Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors*. UpToDate.

<https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>

Madhusudana Rao, K., Mallikarjuna, B., Krishna Rao, K. S. V., Siraj, S., Chowdoji Rao, K., & Subha, M. C. S. (2013). Novel thermo/pH sensitive nanogels composed from poly(N-vinylcaprolactam) for controlled release of an anticancer drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 891–897. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.009>

Magaña, H., Cornejo-Bravo, J. M., Cordova-Guerrero, I., Palomino, K., & Serrano-Medina, A. (2017). pH-dependent release of antihypertensives from complexes with poly(carboxyalkyl methacrylamides). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39(October), 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.008>

Manchun, S., Cheewatanakornkool, K., Dass, C. R., & Sriamornsak, P. (2014). Novel pH-responsive dextrin nanogels for doxorubicin delivery to cancer cells with reduced cytotoxicity to cardiomyocytes and stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 114, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.002>

Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2013). Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance ☆ , ☆☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1866–1879. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.019>

Marley, A. R., & Nan, H. (2016). Epidemiology of colorectal cancer. In *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* (Vol. 7, Issue 3, pp. 105–114). E-Century Publishing Corporation. <https://doi.org/10.3109/9781420016307-2>

Maspes, A., Pizzetti, F., Rossetti, A., Makvandi, P., Sitia, G., & Rossi, F. (2021).

*Advances in Bio-Based Polymers for Colorectal Cancer Treatment: Hydrogels and Nanoplatfoms.* 7(6). <https://doi.org/10.3390/gels7010006>

Meel, R. Van Der, Sulheim, E., Shi, Y., Kiessling, F., & Mulder, W. J. M. (2019). Smart cancer nanomedicine. *Nature Nanotechnology*, 14(November), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>

Melgarejo Diaz, M. (2015). *Sistemas peguilados para administración de fármacos. Aplicación a cáncer colorrectal y enfermedad de Fabry.* <http://www.tdx.cat/handle/10803/347214>

Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 740–748. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007476>

Mohd-zahid, M. H., Mohamud, R., & Che, A. (2020). *RSC Advances Colorectal cancer stem cells : a review of targeted drug delivery by gold nanoparticles.* 973–985. <https://doi.org/10.1039/c9ra08192e>

Molina, M., Asadian-Birjand, M., Balach, J., Bergueiro, J., Miceli, E., & Calderó, M. (2015). Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev*, 44, 6161. <https://doi.org/10.1039/c5cs00199d>

Motokawa, R., Soap free emulsion polymerization and phase behavior of poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(ethylene glycol) in aqueous media. Chiba university, Japon. 2005, pp 4-5.

National Cancer Institute. (2015). *What is cancer.* NIH. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

National Cancer Institute. (2020, September 25). *Cancer Statistics.*

<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>

- Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Elena, L., Aurica, N., & Chiriac, P. (2017). *Drug Delivery Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications*. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1276232>
- Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Nita, L. E., & Chiriac, A. P. (2017). Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. In *Drug Delivery* (Vol. 24, Issue 1, pp. 539–557). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1276232>
- Nie, S. (2010). *Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine Opsonization & phagocytosis*. 5(4), 523–528. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.23>.Understanding
- Nokhodchi, A., Raja, S., Patel, P., & Asare-Addo, K. (2012). The Role of Oral Controlled Release Matrix Tablets in Drug Delivery Systems. *BioImpacts*, 2(4), 175–187. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.027>
- Pangeni, R., Won Choi, S., Jeon, O.-C., Byun, Y., & Park, J. W. (2016). Multiple nanoemulsion system for an oral combinational delivery of oxaliplatin and 5-fluorouracil: preparation and in vivo evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 6379–6399.
- Paruvathanahalli, Rajinikanth, S., & Jestin, C. (2016). *Development and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil*. 5067–5077.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Vangelie, E., Campos, R., Rodriguez, P., Susana, L., Torres, A., Armando, L., Torres, D., & Grillo, R. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of*

- Nanobiotechnology*, 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Gastrointestinal Stromal Tumors Treatment (PDQ®): Patient Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389367>
- Philip, A. K., & Philip, B. (2010). Colon targeted drug delivery systems: A review on primary and novel approaches. *Oman Medical Journal*, 25(2), 70–78. <https://doi.org/10.5001/omj.2010.24>
- Prasanth, V. V., Jayaprakash, R., & Mathew, S. T. (2012). Colon specific drug delivery systems: A review on various pharmaceutical approaches. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(1), 163–169.
- Pretel, E., Arias, J. L., Cabeza, L., Melguizo, C., Prados, J., Mallandrich, M., Suñer, J., & Clares, B. (2017). Development of biomedical 5-fluorouracil nanoplatfoms for colon cancer chemotherapy: Influence of process and formulation parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1–2), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.055>
- Puértoloas Soto L. (2015). Ensayo de compuestos de oro en células cancerígenas. *Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza*.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. In *Przegląd Gastroenterologiczny* (Vol. 14, Issue 2, pp. 89–103). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Robles, A., Bashashati, M., Contreras, A., Chávez, L. O., Cerro-Rondón, A. Del, Cu, C., McAlice, M., & Deoker, A. (2019). Colorectal Cancer in Hispanics Living Near the U.S.-Mexico Border. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del*

*Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, 71(5), 306–310.

<https://doi.org/10.24875/RIC.19003026>

Rodríguez, J. C., De, B., Fernández, L. N., Garmendia, J. M. A., Lastra Aras, E., Castaño, A. G., Barrio Gil-Fournier, A., & García Girón, C. (2003). *FARMACIA HOSPITALARIA* (Vol. 27).

Sahu, P., Kashaw, S. K., Jain, S., Sau, S., & Iyer, A. K. (2017). Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo studies. *Journal of Controlled Release*, 253, 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.023>

Sahu, P., Kashaw, S. K., Sau, S., Kushwah, V., Jain, S., Agrawal, R. K., & Iyer, A. K. (2019). pH Responsive 5-Fluorouracil Loaded Biocompatible Nanogels For Topical Chemotherapy of Aggressive Melanoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.018>

Sánchez-Barriga, J. J. (2017). Mortality trends and risk of dying from colorectal cancer in the seven socioeconomic regions of Mexico, 2000-2012. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 82(3), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.rgm xen.2017.03.010>

Sánchez Gudín, J. (2019). *Seguridad y calidad de vida en pacientes con cáncer colorrectar no metastásico: 5-fluorouracilo frente a capecitabina*.

Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 3, Issue 1, pp. 1–19). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>

- Serrano-Medina, A., Cornejo-Bravo, J. M., & Licea-Claveríe, A. (2012). Synthesis of pH and temperature sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369(1), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.045>
- Sharma, A., Kaur, A., Jain, U. K., Chandra, R., & Madan, J. (2017). Stealth recombinant human serum albumin nanoparticles conjugating 5-fluorouracil augmented drug delivery and cytotoxicity in human colon cancer, HT-29 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.020>
- Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Letters*, 10(9), 3223–3230. <https://doi.org/10.1021/nl102184c>
- Shishu, Gupta, N., & Aggarwal, N. (2007). Stomach-specific drug delivery of 5-fluorouracil using floating alginate beads. *AAPS PharmSciTech*, 8(2), E143–E149. <https://doi.org/10.1208/pt0802048>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Soni, K. S., Desale, S. S., & Bronich, T. K. (2016). Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*, 240, 109–126. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.009>
- Suhail, M., Rosenholm, J. M., Minhas, M. U., Badshah, S. F., Naeem, A., Khan, K. U., & Fahad, M. (2019). Nanogels as drug-delivery systems: A comprehensive overview. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 10, Issue 11, pp. 697–717). Future

Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0010>

SUN, B., FANG, Y., LI, Z., CHEN, Z., & XIANG, J. (2015). Advances in the application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of gastrointestinal tumors. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(2), 274–280. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.470>

Tawfik, E., Ahamed, M., Almalik, A., Alfaqeeh, M., & Alshamsan, A. (2017). Prolonged exposure of colon cancer cells to 5-fluorouracil nanoparticles improves its anticancer activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.05.010>

Tama Tamai, H., Fujii, A., Suzawa, T.; *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 37, 116.

Tummala, S., Satish Kumar, M. N., & Prakash, A. (2015). Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.010>

Udofot, O., Afram, K., Smith, T., Tshabe, B., Krishnan, S., Sachdeva, M., & Agyare, E. (2016). Pharmacokinetic, biodistribution and therapeutic efficacy of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive PEGylated liposomal nanoparticles in HCT-116 tumor bearing mouse. *Journal of Nature and Science*, 2(1). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200415>

Verastegui, E., & Mohar, A. (2009). Colorectal cancer in Mexico: Should a middle income country invest in screening or in treatment? *European Journal of Health Economics*, 10(SUPPL. 1), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s10198-009-0190-1>

1

Vicario-de-la-Torre, M., & Forcada, J. (2017). The Potential of Stimuli-Responsive

- Nanogels in Drug and Active Molecule Delivery for Targeted Therapy. *Gels*, 3(2), 16. <https://doi.org/10.3390/gels3020016>
- Villarreal-Gómez, L. J., Serrano-Medina, A., José Torres-Martínez, E., Lizeth Perez-González, G., & Manuel Cornejo-Bravo, J. (2018). Polymeric advanced delivery systems for antineoplastic drugs: Doxorubicin and 5-fluorouracil. In *E-Polymers* (Vol. 18, Issue 4, pp. 359–372). European Polymer Federation. <https://doi.org/10.1515/epoly-2017-0202>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 206, p. 107447). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>
- Wadhwa, S., Garg, V., Gulati, M., Kapoor, B., Singh, S. K., & Mittal, N. (2019). Nanovesicles for Nanomedicine: Theory and Practices. *Pharmaceutical Nanotechnology: Basic Protocols, Methods in Molecular Biology, 2000*, 1–17.
- Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual Review of Medicine*, 63, 185–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>
- Wang, C., Yang, S., Gao, L., Wang, L., & Cao, L. (2018). Carboxymethyl pachyman (CMP) reduces intestinal mucositis and regulates the intestinal microflora in 5-fluorouracil-treated CT26 tumour-bearing mice. *Food and Function*, 9(5), 2695–2704. <https://doi.org/10.1039/c7fo01886j>
- Wang, L. L., Huang, S., Guo, H. H., Han, Y. X., Zheng, W. S., & Jiang, J. D. (2016). In situ delivery of thermosensitive gel-mediated 5-fluorouracil microemulsion for the treatment of colorectal cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 10,

2855–2867. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S111351>

Wang, R., Huang, J., Chen, J., Yang, M., Wang, H., Qiao, H., Chen, Z., Hu, L., Di, L., & Li, J. (2019). Enhanced anti-colon cancer efficacy of 5-fluorouracil by epigallocatechin-3-gallate co-loaded in wheat germ agglutinin-conjugated nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *21*, 102068. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102068>

Wang, X., Wang, Y., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2009). Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. *Cancer Research and Treatment*, *41*(1), 1. <https://doi.org/10.4143/crt.2009.41.1.1>

Watts, P. J., Barrow, L., Steed, K. P., Wilson, C. G., Spiller, R. C., Melia, C. D., & Davies, M. C. (1992). The transit rate of different-sized model dosage forms through the human colon and the effects of a lactulose-induced catharsis. *International Journal of Pharmaceutics*, *87*(1–3), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90245-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90245-W)

WHO. (2018). *Cancer*. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Wielnińska, J., Nowacki, A., & Liberek, B. (2019). 5-fluorouracil-complete insight into its neutral and ionised forms. *Molecules*, *24*(20). <https://doi.org/10.3390/molecules24203683>

Wong, K. E., Ngai, S. C., Chan, K.-G., Lee, L.-H., Goh, B.-H., & Chuah, L.-H. (2019). Curcumin Nanoformulations for Colorectal Cancer: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 152. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00152>

Wong, T. W., Colombo, G., & Sonvico, F. (2011). Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. *AAPS PharmSciTech*, *12*(1), 201–214.

<https://doi.org/10.1208/s12249-010-9564-z>

- Wu, C. (2018). Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(2), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.001>
- Wu, X., He, C., Wu, Y., & Chen, X. (2016). Synergistic therapeutic effects of Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for local co-delivery of metformin and 5-fluorouracil in a mouse colon carcinoma model. *Biomaterials*, 75, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.016>
- Wu, Renyi, Lujing Wang, Ran Yin, Rasika Hudlikar, Shanyi Li, Hsiao Chen D. Kuo, Rebecca Peter, Davit Sargsyan, Yue Guo, Xia Liu, and Ah Ng T. Kong. 2020. "Epigenetics/Epigenomics and Prevention by Curcumin of Early Stages of Inflammatory-Driven Colon Cancer." *Molecular Carcinogenesis* 59(2):227–36.
- Xiao, W., Deng, Z., Huang, J., Huang, Z., Zhuang, M., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2019). Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. *Analytical Chemistry*, 91(23), 15114–15122. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03824>
- Yuan, L., Zhang, S., Li, H., Yang, F., Mushtaq, N., Ullah, S., Shi, Y., An, C., & Xu, J. (2018). The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.165>
- Zhang, H., Zhai, Y., Wang, J., & Zhai, G. (2016). New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 60, pp. 560–568). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.041>
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., & Chen, W. S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. In *Molecules* (Vol. 13, Issue 8, pp. 1551–

1569). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

<https://doi.org/10.3390/molecules13081551>

Zhong, J. X., Clegg, J. R., Ander, E. W., & Peppas, N. A. (2018). Tunable poly(methacrylic acid-co-acrylamide) nanoparticles through inverse emulsion polymerization. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 106(6), 1677–1686. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36371>

Zou, Y., Li, D., Shen, M., & Shi, X. (2019). Polyethylenimine-Based Nanogels for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*, 19(11), 1900272. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900272>

**ANEXOS**

**ANEXO 1.** Cálculos para síntesis de nanogeles por el método de polimerización en emulsión

**Formulación 1:**

<b>Reacción 1</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidades</b>
Monómero	CAM10	0.5 g
Entrecruzante	EGDMA 5%	0.0257 mol
Estabilizante	PEGMAN	0.3 g
Iniciador	APS 2%	0.01186 mol

**Cálculos:**

Reacción total 50 ml

**Monómero**

CAM10 (ácido 11-matacriloilamido undecanóico) al 1% w/w

Moles totales= (g)/(PM)

Moles totales= (0.5 g) / (192.22 g/mol) = 0.0026 mol

**Entrecruzante**

EGDMA (Dimetilacrilato de etilenglicol) al 5% mol

g = (Moles totales) (PM) (% del entrecruzante)

g = (0.0026mol) (198.22g/mol) (0.05) = 0.0257 g

densidad = 1.051 g/ml

ml = (g)/(densidad)

ml = (0.0257g) /(1.051g/ml) = 0.0244 ml

microlitros = (0.0244 ml) (1000) = 24.4 microlitros

### **Estabilizante**

PEGMAM (polietilenglicol metil éter metacrilato) 15 mg

$$(0.5g) (0.3g) = 0.15g$$

$$\text{moles} = (g) / (PM)$$

$$\text{moles de PEGMAN} = (0.15g) / (208.0 \text{ g/mol}) = 0.0007211 \text{ moles}$$

### **Iniciador**

APS (Persulfato de amonio) 2%

$$g = (\text{Moles totales}) (PM) (\% \text{ del iniciador})$$

$$g = (0.0026 \text{ mol}) (228.20 \text{ g/mol}) (0.02) = 0.01186 \text{ g}$$

$$\text{miligramos} = (0.01186) (1000) = 11.86 \text{ mg}$$

se pesaron 32 mg

32mg ----- 8ml H<sub>2</sub>O

11.86 mg--- X

$$X = (11.86 \text{ mg}) * (8 \text{ ml}) / 32 \text{ mg} = 2.96 \text{ ml (3ml)}$$

## Formulación 2:

Reacción 2	Reactivo	Cantidades
Monómero	CAM10 1%	0.5 g
Entrecruzante	BAAC 5%	0.02409 mol
Estabilizante	PEGMAN	0.3 g
Iniciador	APS 2%	0.01186 mol

### Cálculos:

Reacción total 50 ml

#### Monómero

CAM10 (ácido 11-mataciloilamido undecanóico) al 1% w/w

Moles = (g)/(PM)

Moles = (0.5 g) / (270 g/mol) = 0.001851 moles

#### Entrecruzante

BAAC (N,N'-bis(acriloil) cistamina) al 5%

g = (Moles totales) (PM) (% del entrecruzante)

g = (0.001851 mol) (260.38 g/mol) (0.05) = 0.024098 g

Miligramos = (0.024098) \*(1000) = 24.09 mg

#### Estabilizante

PEGMAN (polietilenglicol metil éter metacrilato) 15 mg

$$(0.5g) (0.3g) = 0.15g$$

$$\text{moles} = (g) / (PM)$$

$$\text{moles de PEGMAN} = (0.15g) / (208.0 \text{ g/mol}) = 0.0007211 \text{ moles}$$

### **Iniciador**

APS (Persulfato de amonio) 2%

$$g = (\text{Moles totales}) (PM) (\% \text{ del iniciador})$$

$$g = (0.0026 \text{ mol}) (228.20 \text{ g/mol}) (0.02) = 0.01186 \text{ g}$$

$$\text{miligramos} = (0.01186) (1000) = 11.86 \text{ mg}$$

se pesaron 32 mg

32mg --- 8ml H<sub>2</sub>O

11.86 mg --- X

$$X = (11.86 \text{ mg}) * (8 \text{ ml}) / 32 \text{ mg} = \underline{2.96 \text{ ml (3ml)}}$$

(30 miligramos en 3 ml de agua)

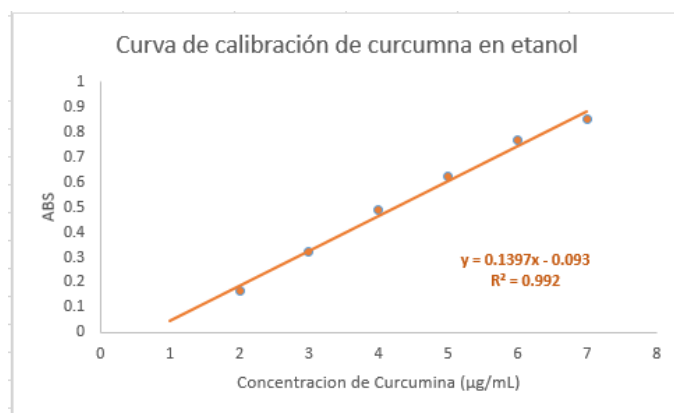
## ANEXO 2. Curva de calibración para el cargado de curcumina con etanol por UV-VIS

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de curcumina y se leyeron las muestras en un espectro de UV-VIS a 427 nm.

**SOLUCION MADRE:** 5 mg de curcumina aforado a 10 mL de etanol

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS 427nm
A	10 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	0.5	0.090
B	20 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	1	0.165
C	40 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	2	0.324
D	60 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	3	0.487
E	80 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	4	0.622
F	100 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	5	0.766
G	120 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	6	0.851

Nota: Se utilizó el respectivo buffer como blanco para cada curva y se lavó la celda de cuarzo con etanol entre cada medición.

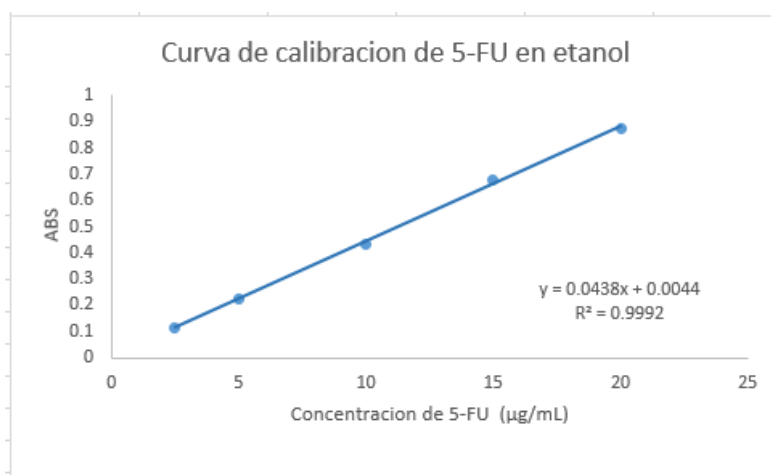


### ANEXO 3. Curva de calibración para el cargado de 5-fluorouracilo con etanol por UV-VIS

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de curcumina y se leyeron las muestras en un espectro de UV-VIS a 275 nm.

**SOLUCION MADRE:** 5 mg de 5-fluorouracilo aforado a 10 mL de etanol

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS 275 nm
A	50 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	2.5	0.115
B	100 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	5	0.223
C	200 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	10	0.434
D	300 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	15	0.675
E	400 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL etanol	20	0.874



#### ANEXO 4. Capacidad de carga y eficiencia de carga para nanoparticulas cargadas con CUR

Capacidad de carga y eficiencia de carga para nanoparticulas EGDMA, PEGMAN+CUR

Ecuación de la recta  $y = 0.1397x - 0.093$

$x = y - 0.093 / 0.1397$

ABS = y

$y = 0.724$

Peso total de liofilizado = 78.2mg

$x = \text{ABS} - \text{Intercepto} / \text{Pendiente}$

$x = 0.724 - 0.093 / 0.1397 = 4.5168 \mu\text{g}$

Dilución de la muestra leída

Dilución = Disolvente / Muestra

Dilución = 4ml / 0.1 ml = 40 factor de dilución

$x = 4.51 * 40 = 180.672 \mu\text{g}$

$180.672 \mu\text{g} / 1000 = 0.1806 \text{ mg}$

1 mg --- 0.1806

78.2 --- x                      x = 14.12 mg

CCF = Masa de fármaco en los nanogeles / Peso del liofilizado

CCF =  $14.12 / 78.2 * 100 = 18.0562 \%$

EC = Masa del fármaco en los nanogeles / Cantidad inicial de fármaco

EC =  $14.12 / 30 * 100 = 47.0666 \%$

Capacidad de carga y eficiencia de carga para nanopartículas BAAC,  
PEGMAN+CUR

$$\text{Ecuación de la recta } y = 0.1397x - 0.093$$

$$x = y - 0.093 / 0.1397$$

$$\text{ABS} = y$$

$$y = 0.741$$

$$\text{Peso total de liofilizado} = 33 \text{ mg}$$

$$x = \text{ABS} - \text{Intercepto} / \text{Pendiente}$$

$$x = 0.741 - 0.093 / 0.1397 = 4.6385 \mu\text{g}$$

Dilución de la muestra leída

$$\text{Dilución} = \text{Disolvente} / \text{Muestra}$$

$$\text{Dilución} = 6 \text{ ml} / 0.1 \text{ ml} = 60 \text{ factor de dilución}$$

$$x = 4.6385 * 60 = 278.31 \mu\text{g}$$

$$278.31 \mu\text{g} / 1000 = 0.27831 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mg} \text{ --- } 0.27831$$

$$33 \text{ mg} \text{ --- } x \quad x = 9.1842 \text{ mg}$$

$$\text{CCF} = \text{Masa de fármaco en los nanogeles} / \text{Peso del liofilizado}$$

$$\text{CCF} = 9.1842 / 33 * 100 = 29.8224 \%$$

$$\text{EC} = \text{Masa del fármaco en los nanogeles} / \text{Cantidad inicial de fármaco}$$

$$\text{EC} = 9.1842 / 20 * 100 = 45.921 \%$$

**ANEXO 5.** Capacidad de carga y eficiencia de carga para nano partículas  
cargadas con 5-FU

Ecuación de la recta  $y = 0.0438x + 0.0044$

$x = y - 0.0044 / 0.0438$

ABS = y

$y = 0.177$

Peso total de liofilizado = 25.5mg

$x = \text{ABS} - \text{Intercepto} / \text{Pendiente}$

$x = 0.177 - 0.0044 / 0.0438 = 3.9406 \mu\text{g}$

Dilución de la muestra leída

Dilución = Disolvente / Muestra

Dilución = 4ml / 0.1 ml = 40 factor de dilución

$x = 3.9406 * 40 = 157.6255 \mu\text{g}$

$157.6255 \mu\text{g} / 1000 = 0.1576 \text{ mg}$

1 mg --- 0.1576

25.5 --- x                     $x = 4.0194 \text{ mg}$

CCF = Masa de fármaco en los nanogeles / Peso del liofilizado

CCF =  $4.0194 / 25.5 * 100 = 15.76 \%$

EC = Masa del fármaco en los nanogeles / Cantidad inicial de fármaco

EC =  $4.0194 / 20 * 100 = 20.09 \%$

## ANEXO 6. Curvas de Calibración para liberación de curcumina

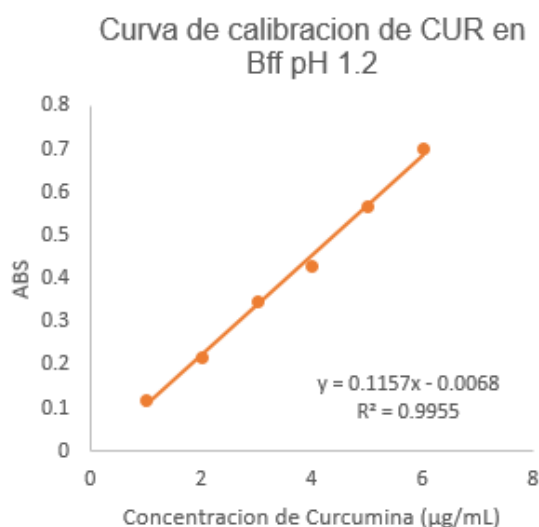
Se preparó 100 ml de buffer a diferentes pH (1.2, 6.8 y 7.4) + 5 mL de tween 80 respecto al buffer para preparar las soluciones a diferentes concentraciones de curcumina y se leyeron las muestras en un espectro de UV a 427 nm.

### Curva de calibración para liberación en buffer pH 1.2 + Tween 80 (5%)

**SOLUCION MADRE:** 10 mg de curcumina aforado a 10 mL de metanol

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS 427 nm
A	10 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	1	0.118
B	20 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	2	0.220
C	30 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	3	0.349
D	40 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	4	0.431
E	50 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	5	0.567
F	60 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	6	0.703

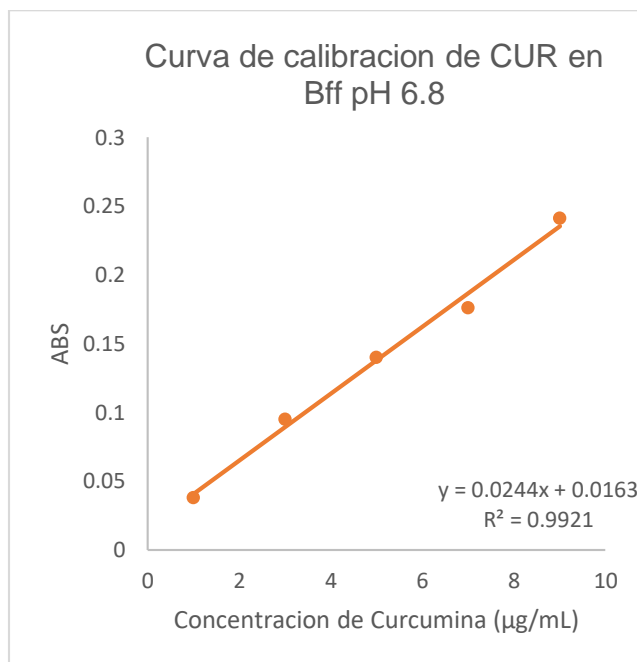
Nota: Se utilizó el respectivo buffer como blanco para cada curva y se lavó la celda de cuarzo con etanol y buffer respectivamente entre cada medición.



## Curva de calibración para liberación en buffer pH 6.8 + Tween 80 (5%)

**SOLUCION MADRE:** 10 mg de curcumina aforado a 10 mL de metanol

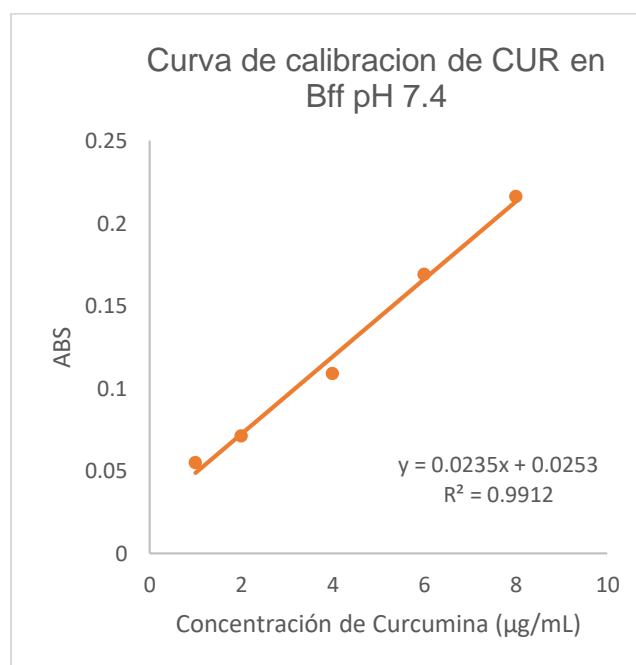
		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS 427 nm
A	10 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	1	0.038
B	30 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	3	0.095
C	50 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	5	0.140
D	70 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	7	0.176
E	90 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	9	0.241



### Curva de calibración para liberación en buffer pH 7.4 + Tween 80 (5%)

**SOLUCION MADRE:** 10 mg de curcumina aforado a 10 mL de metanol

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS 427 nm
A	10 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	1	0.055
B	20 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	2	0.071
C	40 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	4	0.109
D	60 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	6	0.169
E	80 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	8	0.216



## ANEXO 7. Curvas de Calibración para liberación de 5-FU

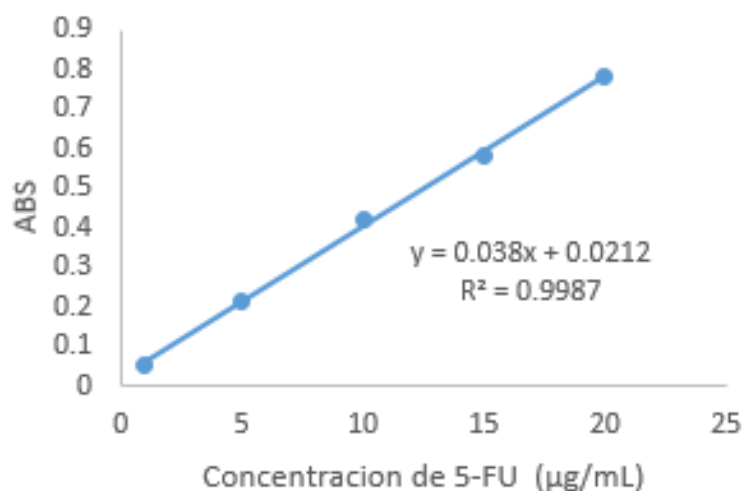
### Curva de calibración para liberación en buffer pH 1.2

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de 5-FU y se leyeron las muestras en un espectro de UV a 427 nm.

**SOLUCION MADRE:** 10 mg de 5-fluorouracilo aforado a 10 mL de **buffer pH 1.2**

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS
A	10 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	1	0.050
B	50 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	5	0.215
C	100 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	10	0.417
D	150 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	15	0.583
E	200 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	20	0.779

Curva de calibración de 5-FU en  
Bff pH 1.2

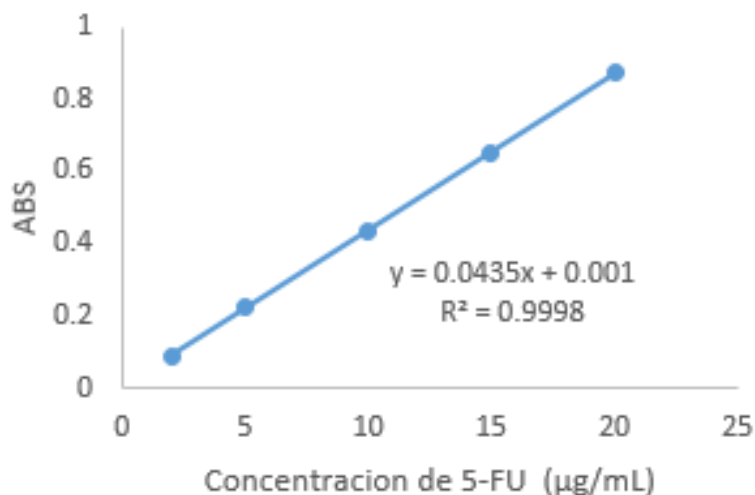


### Curva de calibración para liberación en buffer pH 6.8

**SOLUCION MADRE:** 10 mg de 5-fluorouracilo aforado a 10 mL de **buffer pH 6.8**

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS
A	20 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	2	0.085
B	50 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	5	0.226
C	100 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	10	0.432
D	150 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	15	0.651
E	200 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 6.8	20	0.874

Curva de calibración de 5-FU en  
Bff pH 6.8

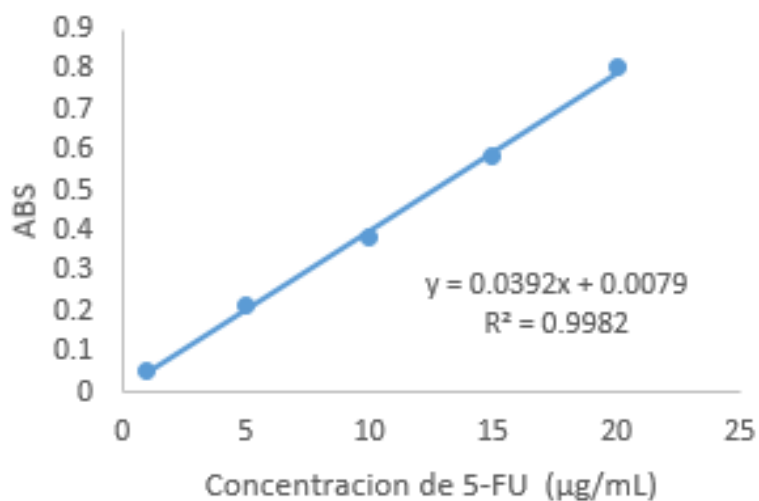


### Curva de calibración para liberación en buffer pH 7.4

**SOLUCION MADRE:** 10 mg de 5-fluorouracilo aforado a 10 mL de **buffer pH 7.4**

		Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS
A	10 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	1	0.052
B	50 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	5	0.212
C	100 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	10	0.382
D	150 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	15	0.587
E	200 $\mu\text{L}$ sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	20	0.804

Curva de calibración de 5-FU en  
Bff pH 7.4



## ANEXO 8. Fracciones liberadas de 5-FU a diferentes pH

Horas	5-FU					5-FU					5-FU					
	Fracciones liberadas a pH 1.2				Fracción liberada Promedio	Fracciones liberadas a pH 6.8				Fracción liberada Promedio	Fracciones liberadas a pH 7.4				Fracción liberada Promedio	DS
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.3396	0.3424	0.3436	0.3419	0.0020	0.3186	0.3192	0.3198	0.3192	0.0006	0.2565	0.2577	0.2571	0.2571	0.0006	
0.5	0.4417	0.4446	0.4441	0.4435	0.0015	0.5761	0.5774	0.5768	0.5768	0.0006	0.3520	0.3515	0.3527	0.3521	0.0006	
0.75	0.4858	0.4882	0.4888	0.4876	0.0016	0.6541	0.6566	0.6554	0.6553	0.0013	0.4338	0.4357	0.4357	0.4350	0.0011	
1	0.5198	0.5206	0.5212	0.5205	0.0007	0.7013	0.7033	0.7032	0.7026	0.0011	0.5322	0.5353	0.5347	0.5341	0.0017	
2	0.5622	0.5620	0.5631	0.5624	0.0006	0.7768	0.7764	0.7776	0.7769	0.0006	0.5478	0.5492	0.5486	0.5485	0.0007	
3	0.5732	0.5746	0.5741	0.5740	0.0007	0.7981	0.7990	0.7996	0.7989	0.0007	0.5943	0.5927	0.5946	0.5939	0.0010	
4	0.5889	0.5915	0.5921	0.5908	0.0017	0.8084	0.8110	0.8098	0.8097	0.0013	0.5914	0.5916	0.5898	0.5909	0.0010	
5	0.5733	0.5754	0.5755	0.5747	0.0012	0.8016	0.8013	0.8025	0.8018	0.0006	0.6071	0.6066	0.6078	0.6072	0.0006	
6	0.5770	0.5998	0.5887	0.5885	0.0114	0.8142	0.8127	0.8146	0.8138	0.0010	0.5946	0.5972	0.5960	0.5959	0.0013	
7	0.5769	0.5799	0.5795	0.5787	0.0016	0.8259	0.8249	0.8256	0.8254	0.0005	0.6121	0.6245	0.6184	0.6183	0.0062	
8	0.5817	0.5853	0.5855	0.5842	0.0022	0.8456	0.8464	0.8471	0.8463	0.0008	0.6405	0.6406	0.6397	0.6403	0.0005	
9	0.5771	0.5797	0.5789	0.5786	0.0013	0.8499	0.8745	0.8624	0.8623	0.0123	0.6334	0.6334	0.6344	0.6337	0.0006	
10	0.5819	0.5828	0.5836	0.5828	0.0009	0.8419	0.8553	0.8488	0.8487	0.0067	0.6369	0.6357	0.6373	0.6366	0.0008	
11	0.5812	0.5839	0.5847	0.5833	0.0018	0.8432	0.8436	0.8436	0.8435	0.0002	0.6490	0.6502	0.6507	0.6500	0.0009	
12	0.5789	0.6083	0.6025	0.5966	0.0156	0.8607	0.8617	0.8605	0.8610	0.0006	0.6458	0.6476	0.6469	0.6468	0.0009	
24	0.5955	0.5992	0.5982	0.5976	0.0019	0.8946	0.8980	0.8974	0.8967	0.0018	0.6564	0.6583	0.6575	0.6574	0.0009	
36	0.6334	0.6416	0.6400	0.6384	0.0044	0.8535	0.8575	0.8557	0.8556	0.0020	0.6364	0.6432	0.6491	0.6429	0.0064	

## ANEXO 9. Fracciones liberadas de 5-FU-EGDMA a diferentes pH

Horas	5-FU-EGDMA					5-FU-EGDMA					5-FU-EGDMA							
	Fracciones liberadas a pH 1.2				Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 6.8				Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 7.4				Fracción liberada Promedio	DS
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.0518	0.0523	0.0529	0.0523	0.0006	0.1694	0.1815	0.1937	0.1815	0.0122	0.4816	0.4870	0.4843	0.4843	0.0027			
0.5	0.0805	0.0794	0.0800	0.0800	0.0005	0.3195	0.3151	0.3180	0.3175	0.0022	0.5484	0.5459	0.5513	0.5485	0.0027			
0.75	0.0790	0.0807	0.0807	0.0801	0.0010	0.3935	0.3913	0.3931	0.3926	0.0012	0.5955	0.5956	0.6038	0.5983	0.0048			
1	0.0985	0.0980	0.0992	0.0986	0.0006	0.4491	0.4480	0.4511	0.4494	0.0015	0.6219	0.6058	0.6143	0.6140	0.0081			
2	0.1193	0.1176	0.1177	0.1182	0.0009	0.5306	0.5331	0.5326	0.5321	0.0014	0.6756	0.6832	0.6758	0.6782	0.0043			
3	0.1373	0.1400	0.1396	0.1390	0.0015	0.5561	0.5600	0.5606	0.5589	0.0025	0.6737	0.6627	0.6766	0.6710	0.0073			
4	0.1402	0.1397	0.1392	0.1397	0.0005	0.5685	0.5664	0.5683	0.5677	0.0011	0.7413	0.7244	0.7334	0.7330	0.0084			
5	0.1291	0.1314	0.1303	0.1303	0.0011	0.5697	0.5712	0.5731	0.5713	0.0017	0.7645	0.7552	0.7645	0.7614	0.0054			
6	0.1331	0.1394	0.1288	0.1337	0.0053	0.5702	0.5766	0.5762	0.5743	0.0036	0.6878	0.6808	0.6850	0.6845	0.0035			
7	0.1387	0.1335	0.1443	0.1388	0.0054	0.5762	0.5756	0.5787	0.5768	0.0016	0.6964	0.6920	0.6990	0.6958	0.0036			
8	0.1377	0.1390	0.1384	0.1384	0.0006	0.5916	0.5799	0.5685	0.5800	0.0115	0.7020	0.7083	0.7101	0.7068	0.0043			
9	0.1287	0.1401	0.1345	0.1344	0.0057	0.5825	0.5874	0.5853	0.5851	0.0025	0.7206	0.7272	0.7209	0.7229	0.0037			
10	0.1343	0.1355	0.1341	0.1346	0.0007	0.5773	0.5897	0.6021	0.5897	0.0124	0.7473	0.7298	0.7395	0.7389	0.0087			
11	0.1338	0.1350	0.1353	0.1347	0.0008	0.6018	0.6074	0.6129	0.6074	0.0056	0.7472	0.7427	0.7418	0.7439	0.0029			
12	0.1343	0.1361	0.1353	0.1352	0.0009	0.6023	0.6056	0.6053	0.6044	0.0018	0.7492	0.7689	0.7760	0.7647	0.0139			
24	0.1419	0.1404	0.1429	0.1418	0.0013	0.6303	0.6325	0.6309	0.6312	0.0011	0.8966	0.9151	0.9198	0.9105	0.0123			
36	0.1481	0.1481	0.1491	0.1484	0.0006	0.5735	0.5501	0.5631	0.5622	0.0117	0.8587	0.8421	0.8603	0.8537	0.0101			

## ANEXO 10. Fracciones liberadas de 5-FU-BAAC a diferentes pH

Horas	5-FU-BAAC					5-FU-BAAC					5-FU-BAAC				
	Fracciones liberadas a pH 1.2			Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 6.8			Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 7.4			Fracción liberada Promedio	DS
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.1834	0.1846	0.1840	0.1840	0.0006	0.3338	0.3314	0.3326	0.3326	0.0012	0.3435	0.3428	0.3442	0.3435	0.0007
0.5	0.2668	0.2652	0.2668	0.2663	0.0009	0.5450	0.5474	0.5462	0.5462	0.0012	0.4984	0.4991	0.4998	0.4991	0.0007
0.75	0.3541	0.3552	0.3547	0.3547	0.0005	0.6516	0.6504	0.6529	0.6516	0.0012	0.5641	0.5627	0.5635	0.5634	0.0007
1	0.4070	0.4076	0.4065	0.4071	0.0005	0.7249	0.7493	0.7372	0.7371	0.0122	0.6599	0.6605	0.6592	0.6599	0.0006
2	0.4899	0.4922	0.4911	0.4911	0.0011	0.8550	0.8534	0.8543	0.8542	0.0008	0.7247	0.7180	0.7315	0.7247	0.0068
3	0.5174	0.5007	0.5174	0.5118	0.0096	0.8988	0.8983	0.8968	0.8980	0.0010	0.7479	0.7490	0.7489	0.7486	0.0006
4	0.5179	0.5185	0.5185	0.5183	0.0004	0.9151	0.9146	0.9167	0.9155	0.0011	0.7447	0.7465	0.7470	0.7461	0.0012
5	0.5239	0.5228	0.5245	0.5237	0.0008	0.9237	0.9256	0.9265	0.9252	0.0015	0.7526	0.7511	0.7523	0.7520	0.0008
6	0.5250	0.5240	0.5240	0.5243	0.0006	0.9399	0.9370	0.9404	0.9391	0.0018	0.7396	0.7462	0.7535	0.7465	0.0069
7	0.5289	0.5290	0.5301	0.5293	0.0007	0.9460	0.9490	0.9477	0.9476	0.0015	0.7625	0.7666	0.7654	0.7648	0.0021
8	0.5324	0.5308	0.5320	0.5317	0.0008	0.9525	0.9519	0.9506	0.9517	0.0010	0.7577	0.7599	0.7586	0.7588	0.0011
9	0.5343	0.5349	0.5333	0.5342	0.0008	0.9520	0.9490	0.9525	0.9512	0.0019	0.7891	0.7873	0.7880	0.7881	0.0009
10	0.5386	0.5392	0.5392	0.5390	0.0004	0.9738	0.9767	0.9754	0.9753	0.0015	0.7945	0.7934	0.7947	0.7942	0.0007
11	0.5407	0.5347	0.5464	0.5406	0.0058	0.9844	0.9862	0.9873	0.9860	0.0015	0.7899	0.7968	0.7941	0.7936	0.0035
12	0.5374	0.5479	0.5433	0.5429	0.0053	0.9664	0.9659	0.9683	0.9669	0.0012	0.7951	0.7962	0.7954	0.7956	0.0006
24	0.5631	0.5629	0.5619	0.5626	0.0006	0.9505	0.9523	0.9536	0.9522	0.0015	0.8019	0.8009	0.8001	0.8010	0.0009
36	0.5619	0.5628	0.5629	0.5625	0.0005	0.8808	0.8851	0.8851	0.8837	0.0025	0.8365	0.8504	0.8441	0.8437	0.0070

## ANEXO 11. Fracciones liberadas de CUR a diferentes pH

Horas	CUR					CUR					CUR				
	Fracciones liberadas a pH 1.2			Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 6.8			Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 7.4			Fracción liberada Promedio	DS
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.0028	0.0038	0.0010	0.0025	0.0014	0.0019	0.0046	0.0046	0.0037	0.0016	0.0032	0.0122	0.0077	0.0077	0.0045
0.5	0.0112	0.0126	0.0111	0.0116	0.0008	0.0020	0.0048	0.0102	0.0057	0.0042	0.0033	0.0126	0.0125	0.0095	0.0054
0.75	0.0116	0.0094	0.0097	0.0102	0.0012	0.0020	0.0077	0.0133	0.0077	0.0056	0.0079	0.0176	0.0129	0.0128	0.0049
1	0.0313	0.0299	0.0353	0.0321	0.0028	0.0048	0.0107	0.0165	0.0107	0.0058	0.0127	0.0182	0.0179	0.0163	0.0031
2	0.0269	0.0255	0.0283	0.0269	0.0014	0.0430	0.0518	0.0524	0.0491	0.0052	0.0177	0.0144	0.0230	0.0184	0.0044
3	0.0251	0.0227	0.0261	0.0246	0.0017	0.0528	0.0510	0.0652	0.0563	0.0077	0.0228	0.0238	0.0329	0.0265	0.0055
4	0.0232	0.0212	0.0238	0.0227	0.0014	0.0275	0.0229	0.0431	0.0312	0.0105	0.0281	0.0382	0.0340	0.0334	0.0050
5	0.0271	0.0246	0.0282	0.0266	0.0018	0.0420	0.0372	0.0499	0.0430	0.0064	0.0471	0.0530	0.0712	0.0571	0.0126
6	0.0362	0.0340	0.0355	0.0352	0.0011	0.0461	0.0465	0.0569	0.0499	0.0061	0.0713	0.0909	0.0963	0.0862	0.0131
7	0.0479	0.0461	0.0480	0.0474	0.0011	0.0693	0.0725	0.0778	0.0732	0.0042	0.1190	0.1437	0.1538	0.1388	0.0179
8	0.0513	0.0490	0.0519	0.0507	0.0015	0.0961	0.0939	0.1020	0.0973	0.0042	0.1277	0.1398	0.1366	0.1347	0.0063
9	0.0594	0.0565	0.0604	0.0588	0.0020	0.0994	0.1025	0.1081	0.1033	0.0044	0.2313	0.2572	0.2404	0.2430	0.0132
10	0.0658	0.0647	0.0678	0.0661	0.0016	0.1189	0.1140	0.1278	0.1202	0.0070	0.2168	0.2437	0.2261	0.2289	0.0136
11	0.0711	0.0700	0.0718	0.0709	0.0009	0.1499	0.1366	0.1509	0.1458	0.0080	0.2692	0.2698	0.2787	0.2726	0.0053
12	0.0792	0.0767	0.0785	0.0781	0.0013	0.1711	0.1682	0.1774	0.1722	0.0047	0.2872	0.2876	0.2968	0.2906	0.0054
24	0.0866	0.0850	0.0864	0.0860	0.0009	0.2390	0.2279	0.2373	0.2347	0.0060	0.2965	0.3058	0.2973	0.2999	0.0051
36	0.0938	0.0925	0.0944	0.0936	0.0010	0.2931	0.2788	0.3020	0.2913	0.0117	0.3194	0.3243	0.3109	0.3182	0.0068
48	0.1235	0.1205	0.1247	0.1229	0.0022	0.3705	0.3530	0.3824	0.3686	0.0148	0.3517	0.3431	0.3563	0.3504	0.0067
72	0.1818	0.1791	0.1812	0.1807	0.0014	0.6271	0.6116	0.6365	0.6251	0.0125	0.3895	0.3713	0.3625	0.3744	0.0138
84	0.2028	0.2005	0.2030	0.2021	0.0014	0.7353	0.7357	0.7450	0.7387	0.0055	0.4147	0.4093	0.4271	0.4170	0.0092
96	0.2197	0.2187	0.2213	0.2199	0.0013	0.8333	0.8202	0.8404	0.8313	0.0103	0.4946	0.4843	0.4983	0.4924	0.0073
108	0.2448	0.2209	0.2543	0.2400	0.0172	0.9313	0.9015	0.9467	0.9265	0.0230	0.5183	0.5030	0.5131	0.5115	0.0078
120	0.2486	0.2459	0.2488	0.2478	0.0016	0.9343	0.9224	0.9473	0.9347	0.0125	0.5244	0.5039	0.4962	0.5082	0.0146

## ANEXO 12. Fracciones liberadas de CUR-BAAC a diferentes pH

Horas	CUR-BAAC					CUR-BAAC					CUR-BAAC				
	Fracciones liberadas a pH 1.2			Fracción liberada		Fracciones liberadas a pH 6.8			Fracción liberada		Fracciones liberadas a pH 7.4			Fracción liberada	
				Promedio	DS				Promedio	DS				Promedio	DS
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.0166	0.0148	0.0143	0.0152	0.0012	0.0117	0.0030	0.0030	0.0059	0.0050	0.0321	0.0265	0.0265	0.0284	0.0033
0.5	0.0273	0.0277	0.0281	0.0277	0.0004	0.0035	0.0075	0.0032	0.0047	0.0024	0.0277	0.0331	0.0444	0.0351	0.0085
0.75	0.0365	0.0351	0.0365	0.0360	0.0008	0.0166	0.0078	0.0076	0.0107	0.0052	0.0400	0.0344	0.0461	0.0401	0.0059
1	0.0314	0.0304	0.0323	0.0314	0.0009	0.0390	0.0124	0.0122	0.0212	0.0154	0.0471	0.0412	0.0646	0.0510	0.0122
2	0.0330	0.0351	0.0348	0.0343	0.0012	0.0491	0.0389	0.0170	0.0350	0.0164	0.0543	0.0595	0.0669	0.0603	0.0063
3	0.0341	0.0336	0.0346	0.0341	0.0005	0.0595	0.0490	0.0394	0.0493	0.0101	0.0618	0.0672	0.0748	0.0680	0.0065
4	0.0342	0.0328	0.0343	0.0338	0.0009	0.0833	0.0638	0.0842	0.0771	0.0115	0.0582	0.0752	0.0829	0.0721	0.0126
5	0.0353	0.0333	0.0358	0.0348	0.0013	0.1123	0.1008	0.1047	0.1059	0.0058	0.0714	0.0720	0.0800	0.0745	0.0048
6	0.0373	0.0366	0.0364	0.0368	0.0004	0.1509	0.1261	0.1431	0.1401	0.0127	0.0624	0.0856	0.0825	0.0768	0.0126
7	0.0388	0.0377	0.0384	0.0383	0.0006	0.1822	0.2043	0.2046	0.1971	0.0129	0.0529	0.0826	0.0906	0.0754	0.0198
8	0.0386	0.0397	0.0386	0.0390	0.0006	0.2144	0.2245	0.2248	0.2213	0.0059	0.0431	0.0795	0.0877	0.0701	0.0237
9	0.0396	0.0408	0.0410	0.0405	0.0008	0.2259	0.2452	0.2412	0.2374	0.0102	0.0666	0.0874	0.0845	0.0795	0.0112
10	0.0443	0.0465	0.0463	0.0457	0.0012	0.2811	0.2707	0.2752	0.2757	0.0052	0.0798	0.0955	0.0924	0.0892	0.0083
11	0.0465	0.0487	0.0498	0.0483	0.0017	0.2902	0.2839	0.2799	0.2846	0.0052	0.0933	0.1039	0.1288	0.1086	0.0182
12	0.0486	0.0496	0.0507	0.0496	0.0011	0.3037	0.2972	0.2930	0.2980	0.0054	0.1017	0.1124	0.1438	0.1193	0.0219
24	0.0613	0.0637	0.0649	0.0633	0.0018	0.3477	0.3411	0.3237	0.3375	0.0124	0.1328	0.1381	0.1593	0.1434	0.0140
36	0.0740	0.0723	0.0749	0.0738	0.0013	0.3496	0.3428	0.3378	0.3434	0.0059	0.2157	0.2266	0.2541	0.2321	0.0198
48	0.0876	0.0826	0.0890	0.0864	0.0033	0.3860	0.3747	0.3782	0.3796	0.0058	0.3129	0.3409	0.3354	0.3297	0.0149
72	0.1052	0.1042	0.1025	0.1040	0.0014	0.4363	0.4377	0.4154	0.4298	0.0125	0.5431	0.5946	0.5943	0.5773	0.0296
84	0.1152	0.1142	0.1110	0.1135	0.0022	0.4578	0.4550	0.4405	0.4511	0.0093	0.5900	0.6093	0.6088	0.6027	0.0110
96	0.1209	0.1203	0.1188	0.1200	0.0011	0.5056	0.4854	0.4791	0.4900	0.0138	0.5984	0.6013	0.6005	0.6001	0.0015
108	0.1289	0.1283	0.1268	0.1280	0.0011	0.5460	0.5209	0.5491	0.5387	0.0155	0.5839	0.5978	0.5912	0.5910	0.0070
120	0.1294	0.1301	0.1299	0.1298	0.0004	0.5353	0.5137	0.5344	0.5278	0.0122	0.6245	0.6386	0.6316	0.6315	0.0071

### ANEXO 13. Fracciones liberadas de CUR-EGDMA a diferentes pH

Horas	CUR-EGDMA					CUR-EGDMA					CUR-EGDMA				
	Fracciones liberadas a pH 1.2			Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 6.8			Fracción liberada Promedio	DS	Fracciones liberadas a pH 7.4			Fracción liberada Promedio	DS
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.0019	0.0019	0.0033	0.0024	0.0008	0.0073	0.0100	0.0100	0.0091	0.0016	0.0212	0.0438	0.0077	0.0242	0.0182
0.5	0.0011	0.0006	0.0016	0.0011	0.0005	0.0076	0.0050	0.0023	0.0050	0.0027	0.0220	0.0454	0.0080	0.0251	0.0189
0.75	0.0030	0.0016	0.0030	0.0025	0.0008	0.0079	0.0106	0.0051	0.0079	0.0028	0.0228	0.0471	0.0082	0.0260	0.0196
1	0.0021	0.0016	0.0027	0.0021	0.0005	0.0109	0.0300	0.0242	0.0217	0.0098	0.0236	0.0487	0.0085	0.0269	0.0203
2	0.0045	0.0026	0.0050	0.0040	0.0013	0.0031	0.0066	0.0088	0.0062	0.0029	0.0244	0.0504	0.0088	0.0279	0.0210
3	0.0056	0.0059	0.0066	0.0060	0.0005	0.0222	0.0285	0.0254	0.0254	0.0032	0.0252	0.0520	0.0181	0.0318	0.0179
4	0.0062	0.0070	0.0068	0.0067	0.0004	0.0447	0.0540	0.0535	0.0507	0.0052	0.0260	0.0672	0.0549	0.0493	0.0211
5	0.0060	0.0077	0.0071	0.0069	0.0009	0.0490	0.0559	0.0527	0.0525	0.0034	0.0358	0.0378	0.0388	0.0375	0.0015
6	0.0071	0.0094	0.0091	0.0085	0.0012	0.0534	0.0632	0.0626	0.0598	0.0055	0.0730	0.0974	0.0807	0.0837	0.0124
7	0.0096	0.0106	0.0103	0.0102	0.0005	0.0634	0.0735	0.0729	0.0699	0.0057	0.1252	0.1682	0.1693	0.1542	0.0252
8	0.0099	0.0109	0.0107	0.0105	0.0005	0.0655	0.0732	0.0699	0.0695	0.0039	0.2017	0.2191	0.2204	0.2137	0.0104
9	0.0116	0.0127	0.0124	0.0122	0.0005	0.0704	0.0837	0.0775	0.0772	0.0067	0.2178	0.2355	0.2237	0.2257	0.0090
10	0.0124	0.0135	0.0132	0.0131	0.0006	0.0862	0.0945	0.0908	0.0905	0.0042	0.2433	0.2659	0.2584	0.2558	0.0115
11	0.0165	0.0162	0.0173	0.0167	0.0005	0.0998	0.1137	0.1154	0.1096	0.0086	0.2469	0.2610	0.2580	0.2553	0.0074
12	0.0188	0.0186	0.0196	0.0190	0.0006	0.1165	0.1281	0.1272	0.1239	0.0065	0.2774	0.2961	0.2843	0.2860	0.0095
24	0.0469	0.0420	0.0468	0.0453	0.0028	0.2097	0.2190	0.2235	0.2174	0.0070	0.3945	0.4677	0.4421	0.4348	0.0371
36	0.0664	0.0627	0.0622	0.0638	0.0023	0.3118	0.3430	0.3450	0.3332	0.0186	0.5382	0.5957	0.5785	0.5708	0.0295
48	0.0783	0.0805	0.0803	0.0797	0.0012	0.3822	0.4008	0.4056	0.3962	0.0124	0.6191	0.6242	0.6338	0.6257	0.0074
72	0.1122	0.1130	0.1170	0.1140	0.0026	0.5254	0.5418	0.5441	0.5371	0.0102	0.6529	0.6576	0.6543	0.6549	0.0024
84	0.1256	0.1210	0.1265	0.1244	0.0030	0.6518	0.6767	0.6791	0.6692	0.0151	0.6781	0.6870	0.6884	0.6845	0.0056
96	0.1298	0.1305	0.1321	0.1308	0.0012	0.7606	0.7781	0.7806	0.7731	0.0109	0.7080	0.7664	0.7501	0.7415	0.0301
108	0.1381	0.1384	0.1396	0.1387	0.0008	0.7776	0.7874	0.7900	0.7850	0.0065	0.7834	0.8164	0.8132	0.8043	0.0182
120	0.1416	0.1405	0.1417	0.1412	0.0007	0.8187	0.8313	0.8286	0.8262	0.0066	0.8111	0.8313	0.8283	0.8236	0.0109