

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE MICROGELES ANFOTÉRICOS
SENSIBLES A LA TEMPERATURA”**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. KARLA ALEJANDRA SUÁREZ MERAZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

TIJUANA, B.C.

ENERO 2014

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

FOLIO No. 112
Tijuana, B. C., a 3 de diciembre de 2013

C. Karla Alejandra Suárez Meraz
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

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

Es propuesto, por el C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo.

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema "SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE MICROGELES ANFOTÉRICOS SENSIBLES A
LA TEMPERATURA".


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

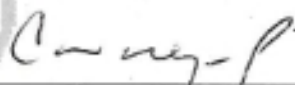
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- TEORÍA GENERAL
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Q. Noemi Hernández Hernández
Sub-Director Secretario


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a quien tenga algo de curiosidad sobre el tema y pueda llegar a ocupar información para su próximo proyecto, espero sea de utilidad; no es fácil entender de polímeros, pero confío en que llegarán a disfrutar tanto de su aprendizaje como yo disfruté del mío... suerte.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Patricia Meraz y Carlos Suárez, quienes a través de su paciencia y cariño inculcaron en mí la curiosidad por aprender y la importancia de superarme día con día, sin ellos y sin Dios no estaría aquí. Asimismo a mis hermanas Diana y Leslie Suarez, que me motivan a querer ser un buen ejemplo a seguir.

Agradezco con personal afecto a mi esposo Sergio González, su inmensa ayuda en la culminación de esta etapa en mi formación profesional, pero sobre todo, por compartir su proyecto de vida con el mío con mucho cariño, paciencia y orgullo.

Un especial agradecimiento a mi asesor de tesis, el Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por su apoyo, paciencia, conocimientos y sobre todo, por creer en mí para la realización de este proyecto.

A la Dra. Aracely Serrano Medina y a la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo por haber formado parte de mi comité para la evaluación del trabajo aquí presentado; gracias a ambas por tener la disposición de ayudarme en las eventualidades técnicas que se presentaron durante mi estancia en la facultad.

A la Dra. Amelia Olivas por su atenta y efectiva colaboración.

De igual manera a mis compañeros del laboratorio de Biofarmacia: Dalia Castro, Héctor Magaña, Víctor Gómez y Kenia Palomino por su cooperación en cualquier situación requerida y sentido de responsabilidad. Agradezco de manera especial a la Dra. Claudia Obeso Vera por su gran ayuda en el laboratorio, consejos y paciencia. De la misma manera quiero corresponder a la futura Dra. Elizabeth Sánchez Bustos, por tener siempre el ánimo de estar en la mejor disposición de cooperar.

Gracias a mis compañeros de posgrado por hacer del área de trabajo un segundo hogar y darme los mejores recuerdos. Con especial cariño a la M.C. Anahí García Rubio por todo su apoyo y amistad incondicional, confianza, sinceridad y por saber escuchar cuando se necesita. También al M.C. Víctor Iriarte, por ser el mejor compañero de cubículo que podía tener.

Un especial reconocimiento mis profesores: Juan Cruz Reyes, Rodolfo Salgado, José Quintana, Iván Córdova, quienes me guiaron y resolvieron mis dudas durante este tiempo de mi formación profesional.

Finalmente agradezco al personal administrativo, que de alguna u otra manera contribuyeron para la culminación de este proyecto.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la dirección del Dr. José Manuel Cornejo Bravo y en colaboración con el Centro de Nanociencias y Nanotecnología campus Ensenada.

Dicho trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) mediante una beca otorgada para la realización de estudios de posgrado y el desarrollo de esta investigación a través del proyecto SEP CONACYT (CB 2010-1-157173)

CONTENIDO	
HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABLAS	xv
VITA Y ÁREA DE ESTUDIO	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	23
I.2 HIPÓTESIS	27
I.3 OBJETIVO GENERAL	28
I.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28

CAPÍTULO II. TEORÍA GENERAL

II.1 LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS	30
II.1.1 Dispersiones coloidales.....	30
II.1.2 Dispersiones coloidales en la industria farmacéutica.....	31
II.1.3 Hidrogeles.....	31
II.2 POLÍMEROS INTELIGENTES	34
II.2.1 Polímeros sensibles a la temperatura.....	36
II.2.1.1 Temperatura crítica inferior de solución.....	37
II.2.1.2 Métodos analíticos para determinar la LCST.....	39

II.2.1.3	NIPAAm, un material termosensible.....	39
II.2.2	Materiales sensibles al pH.....	41
II.2.2.1	Polielectrolitos.....	41
II.2.2.2	Polianfolitos.....	43
II.2.3	Materiales sensibles a la temperatura y al pH.....	45
II.3	TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	46
II.3.1	Determinación del tamaño de partícula por técnicas de DLS.....	47
II.3.2	Movimiento Browniano.....	48
II.4	MÉTODOS DE SÍNTESIS DE MICROGELES.....	49
II.5	BIOCOMPATIBILIDAD.....	52

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1	TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y SÍNTESIS DE MONÓMEROS.....	55
III.1.1	Purificación de <i>N</i> -isopropilacrilamida (NIPAAm).....	55
III.1.2	Purificación del <i>N,N</i> -dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) y del ácido metacrílico (AMA).....	55
III.1.3	Síntesis y purificación del ácido metacrililoiloxi- <i>o</i> -benzoico (MAOB).....	55
III.2	SÍNTESIS DE MICROGELES.....	56
III.2.1	Síntesis de microgeles termosensibles con MAOB/DMAEM.....	56
III.2.2	Síntesis de microgeles termosensibles con AMA/DMAEM.....	56
III.2.3	Síntesis de microgeles termosensibles no anfotéricos.....	57
III.3	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	58
III.3.1	Identificación de los grupos funcionales de MAOB.....	58
III.3.2	Determinación del diámetro hidrodinámico (D_h) e índice de polidispersidad (IPD) por la técnica de DLS.....	59
III.3.3	Purificación de microgeles.....	59
III.3.4	Estudio del tamaño respecto al pH.....	60
III.3.5	Estudio del tamaño respecto a la temperatura.....	60
III.3.6	Estudio del efecto del pH en la LCST de los microgeles.....	60

III.3.7 Estudio del efecto de la FI en el punto isoeléctrico (PI).....	61
III.3.8 Estudios de carga superficial de partícula.....	61
III.3.9 Estudios del efecto del pH en la transmitancia.....	61
III.3.10 Determinación de la morfología de las micropartículas.....	62
III.3.11 Rendimiento por gravimetría.....	62
III.3.12 Reconstitución de las micropartículas.....	63
III.3.13 Estudio de la concentración de AMA, MAOB y DMAEM por titulación potenciométrica.....	63
III.3.14 Estudios de espectroscopia infrarrojo de microgeles anfotéricos.....	64

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

IV.1 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MONÓMEROS.....	66
IV.1.1 Purificación de NIPAAm.....	66
IV.1.2 Purificación del DMAEM y AMA.....	66
IV.1.3 Síntesis de MAOB.....	66
IV.1.4 Caracterización de MAOB.....	67
IV.2 SÍNTESIS DE MICROGELES ANFOTÉRICOS.....	67
IV.2.1 Síntesis de microgeles termosensibles con MAOB/DMAEM.....	67
IV.2.2 Síntesis de microgeles anfotéricos con AMA/DMAEM.....	69
IV.3 CARACTERIZACIÓN DE MICROGELES.....	70
IV.3.1 Estudio del D_h de microgeles control y anfotéricos con MAOB/DMAEM y AMA/DMAEM.....	70
IV.3.2 Estudio del tamaño respecto al pH.....	74
IV.3.3 Estudio del tamaño respecto a cambios de temperatura.....	78
IV.3.4 Estudio del efecto del pH en la LCST de los microgeles.....	80
IV.3.5 Estudios de potencial zeta (ζ).....	81
IV.3.6 Efecto de la fuerza iónica en el D_h en el punto isoeléctrico.....	82

IV.3.7 Estudios del efecto del pH en la transmitancia.....	83
IV.3.8 Determinación de la morfología de las micropartículas.....	85
IV.3.9 Rendimiento por gravimetría.....	86
IV.3.10 Reconstitución de las micropartículas.....	87
IV.3.11 Estudio de la concentración de AMA, MAOB y DMAEM por titulación potenciométrica.	87
IV.3.11.1 Cuantificación de MAOB y AMA.....	87
IV.3.11.2 Cuantificación de DMAEM.....	89
IV.3.12 Estudios de espectroscopia infrarrojo.....	95

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS

CAPÍTULO VII. ANEXOS

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ΔG	Cambio en la energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio en la entalpía
ΔS	Cambio en la entropía
Å	Angstrom
D	Coefficiente de difusión
Da	Dalton
D_h	Diámetro hidrodinámico
D_{hI}	Diámetro hidrodinámico en términos de intensidad
D_{hV}	Diámetro hidrodinámico en términos de volumen
$D_{hZ_{Prom}}$	Diámetro hidrodinámico en términos de promedio zeta
I_{PD}	Índice de polidispersidad
K_a	Constante de acidez
kV	Kilovoltio
Mn	Peso molecular promedio en número
N	Normalidad
nm	Nanómetro
pK _a	Logaritmo negativo de la constante de acidez
Q	Grado de hinchamiento
T	Temperatura
ζ	Potencial zeta
μm	Micrómetro
AMA	Ácido metacrílico
APS	Persulfato de amonio
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMAEM	<i>N,N'</i> -dimetilaminoetilmetacrilato
FI	Fuerza iónica
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
IR	Infrarrojo

LCST	Temperatura crítica inferior de solución (por sus siglas en inglés de <i>Lower Critical Solution Temperature</i>)
MAOB	Ácido metacrililoiloxi- <i>o</i> -benzoico
MBA	<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida
NIPAAm	<i>N</i> -isopropilacrilamida
PAMA	Poli(ácido metacrílico)
PDMAEM	Poli(<i>N,N'</i> -dimetilainoetilmetacrilato)
PEG	Polietilenglicol
PEGMEM	Polietilenglicol metiléter metacrilato
PI	Punto isoeléctrico
PMAOB	Poli(ácido metacrililoiloxi- <i>o</i> -benzoico)
PNIPAAm	Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)
RMN-H	Resonancia magnética de protón
SEM	Microscopio electrónico de barrido (por sus siglas en inglés de <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (por sus siglas en inglés de <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
UCST	Temperatura crítica superior de solución (por sus siglas en inglés de <i>Upper Critical Solution Temperature</i>).
UV-Vis	Espectroscopia de ultra violeta-visible.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de <i>N</i> -isopropilacrilamida (NIPAAm).....	25
Figura 2. Monómeros iónicos: (a) AMA, (b) MAOB y (c) DMAEM.....	26
Figura 3. Polímeros como vehículos de fármacos.....	32
Figura 4. Método de síntesis de hidrogeles y estructura final.....	33
Figura 5. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica inteligente.....	34
Figura 6. Factores que afectan el grado de hinchamiento (Q) en los hidrogeles.....	36
Figura 7. Diagrama de fases de un sistema polímero-disolvente a presión constante..	38
Figura 8. Transición del volumen de PNIPAAm en solución acuosa.....	40
Figura 9. Sensibilidad al pH de PAMA, PMAOB y DMAEM pH.....	42
Figura 10. Comportamiento de un polímero anfotérico balanceados en solución.....	44
Figura 11. Comportamiento del grado de hinchamiento (Q) en hidrogeles anfotéricos balanceados.....	45
Figura 12. Comportamiento del grado de hinchamiento (Q) en hidrogeles anfotéricos desbalanceados respecto al pH.....	45
Figura 13. Componentes de un sistema de DLS.....	48
Figura 14. Polimerización en cadena vía radicales libres.....	50
Figura 15. Estructura molecular del monómero PEGMEM.....	52
Figura 16. Ruta de síntesis de MAOB.....	56
Figura 17. Equipo de DLS.....	59
Figura 18. Microscopio TEM.....	63
Figura 19. Equipo de liofilización.....	63
Figura 20. Sistema de recirculación térmica para titulación potenciométrica.....	64
Figura 21. Equipo de FT-IR.....	64
Figura 22. Apariencia de NIPAAm purificada.....	66
Figura 23. Aspecto físico de MAOB.....	66
Figura 24. Aspecto físico de las reacciones control y MAOB/DMAEM a 25 °C.....	68
Figura 25. Aspecto físico de las reacciones control y AMA/DMAEM a 25 °C.....	70
Figura 26. Distribuciones del D_{hI} y D_{hV} de los hidrogeles control.....	73

Figura 27. Distribuciones del D_hI y D_hV de los microgeles anfotéricos MAOB/DMAEM.....	73
Figura 28. Distribuciones del D_hI y D_hV de los microgeles anfotéricos AMA/DMAEM.....	74
Figura 29. Tamaño respecto al pH de la serie MAOB/DMAEM.....	75
Figura 30. Tamaño respecto al pH de la serie AMA/DMAEM.....	75
Figura 31. Tamaño respecto al pH de los microgeles MAOB/DMAEM.....	76
Figura 32. Tamaño respecto al pH de microgeles AMA/DMAEM.....	77
Figura 33. Tamaño respecto a T de la serie MAOB/DMAEM.....	79
Figura 34. Tamaño respecto a T de la serie AMA/DMAEM.....	79
Figura 35. Cambio en el valor de Potencial ζ respecto a pH 3, 4 y 10 (FI 0.1 M).....	82
Figura 36. Comportamiento del %T respecto al pH.....	84
Figura 37. Micrografías TEM de los microgeles MAOB 6.6: DMAEM 6.6.....	85
Figura 38. Aspecto físico de las micropartículas liofilizadas.....	86
Figura 39. Titulación de los microgeles control a 25°C.....	88
Figura 40. Titulación de MAOB 8.1%: DMAEM 13.2% a 25°C.....	92
Figura 41. Titulación de MAOB 8.1%: DMAEM 8.1% a 25°C.....	92
Figura 42. Titulación de MAOB 6.6%: DMAEM 6.6% a 25°C.....	93
Figura 43. Titulación de AMA 16.2%: DMAEM 6.6% a 25°C.....	93
Figura 44. Titulación de AMA 6.6%: DMAEM 6.6% a 25°C.....	94
Figura 45. Titulación de AMA 8.1%: DMAEM 6.6% a 25°C.....	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios y clasificación de hidrogeles.....	33
Tabla 2. Nombre de polímeros inteligentes y tipo de estímulo.....	35
Tabla 3. Polímeros con LCST en soluciones acuosas con potencial para aplicaciones biológicas.....	38
Tabla 4. Valores de pH de distintos compartimentos en el cuerpo.....	41
Tabla 5. Compuestos y concentraciones utilizadas para la síntesis de microgeles anfotéricos MAOB/DMAEM.....	57
Tabla 6. Compuestos y concentraciones utilizadas para la síntesis de microgeles anfotéricos AMA/DMAEM.....	58
Tabla 7. Compuestos y concentraciones utilizadas para la síntesis de microgeles no anfotéricos (control).....	58
Tabla 8. Señales de IR de los principales grupos funcionales de MAOB.....	67
Tabla 9. Especificaciones de la serie MAOB/DMAEM sintetizada.....	68
Tabla 10. Especificaciones de la serie AMA/DMAEM sintetizada.....	70
Tabla 11. Tamaño de los microgeles anfotéricos antes y después de su purificación...	72
Tabla 12. Valor de la LCST y del D_h en medio acuoso.....	78
Tabla 13. Valor de la LCST a valores de pH= 3,4, 10 y con FI= 0.1 M.....	81
Tabla 14. Valores de potencial ζ a cambios de pH.....	81
Tabla 15. Efecto de la fuerza iónica (FI) en el tamaño.....	83
Tabla 16. Valores de pH que corresponden al valor mínimo de %T.....	85
Tabla 17. Rendimiento de los microgeles.....	86
Tabla 18. Titulación básica de los microgeles.....	87
Tabla 19. Titulación ácida de los microgeles.....	90
Tabla 20. Relación de ácido y base presente en los microgeles.....	91

VITA Y ÁREA DE ESTUDIO

Abril 2, 1987	Nacida en Tijuana, Baja California.
2010	Egreso de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo de Universidad autónoma de baja california.
2011	Inicio de estudios de Maestría en Ciencias e Ingeniería en la Universidad Autónoma de Baja California.
2011-2013	Becario del CONACyT.

RESUMEN

“Síntesis y evaluación de microgeles anfotéricos sensibles a la temperatura”

Por

Q.F.B. Karla Alejandra Suárez Meraz

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California, 2013.

Profesor Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Director de Tesis

Mediante la aplicación de un método de polimerización por dispersión, en ausencia de detergente y en una sola etapa, se realizará la síntesis de microgeles anfotéricos con propiedades de estímulo-respuesta al cambio de temperatura, pH y fuerza iónica.

El microgel estará formado principalmente por polímero de poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), el cual es un material termosensible que sufre transición de cadena expandida a glóbulo cuando se encuentra en una temperatura mayor a 32 °C, la cual representa su temperatura crítica inferior de solución (LCST, por sus siglas en inglés).

La estructura de PNIPAAm será modificada, mediante la inserción de comonomeros hidrofílicos (ácidos o básicos), con una doble intención: (i) aumentar su valor de LCST y ajustarla a una temperatura superior a la corporal (> 36 °C); y (ii) incorporar la capacidad de respuesta a estímulos a diferentes valores de pH y fuerza iónica.

Considerando las posibles aplicaciones biológico-farmacéuticas de esta tecnología, existe la posibilidad de que las partículas actúen como inmunógenos *in vivo*; por tal motivo, se vuelve necesaria la incorporación de un componente en la red biocompatible. Para este fin, el polietilenglicol (PEG) es un material que muestra buenas propiedades como acarreador dentro de un sistema biológico.

En resumen, se sintetizaron dos series de microgeles anfotéricos en un solo paso de polimerización y sin uso de agentes tensoactivo: (i) una serie fue compuesta con el

monómero catiónico *N,N*-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) y el ácido metacrílico (AMA) como monómero aniónico; (ii) otra serie se compone por el mismo componente básico (DMAEM) pero en combinación con el ácido 2-metacrilóiloxi-*o*-benzoico (MAOB), un compuesto derivado del ácido salicílico. Ambas series serán copolimerizadas con NIPAAm, metacrilato de polietilenglicol (PEGMEM) (agente estabilizante) y entrecruzadas con *N,N*-metilénbissacrilamida (MBA).

ABSTRACT

“Synthesis and evaluation of ampholytic thermo-sensitive microgels”

by

Q.F.B. Karla Alejandra Suarez Meraz

To obtain the Master on Sciences and Engineering

Autonomous University of Baja California, 2011

Jose Manuel Cornejo Bravo, PhD

Thesis advisor

By applying a dispersion polymerization method in the absence of a detergent in a single step, we performed the synthesis of microgels with amphoteric properties of stimulus-response.

The particles were polymer composed mainly of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), a heat sensitive material which undergoes a transition from expanded form to curled globule when in a temperature greater than 32 ° C, which represents its critical temperature lower solution (LCST).

PNIPAAm structure was modified by insertion of hydrophilic monomers (acidic or basic), with a double porpoise: (i) increase LCST value and adjusted to a temperature above the body temperature (>36 ° C) and (ii) incorporating media stimulus-response, i.e., different values of pH and salt concentration.

Considering the possible biological and pharmaceutical applications of this technology, there is the possibility that the modified microparticles act as immunogens *in vivo*, for this reason, it becomes necessary to incorporate a biocompatible monomer to increase the time in the body system.

To this porpoise, the polyethylene glycol (PEG) is a material that shows good properties as a carrier in a biological system. In summary, we polymerized microgels in one

step and without surfactants, using NIPAAm crosslinked with *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (MBA) and co-polymerized with (i) the cationic monomer *N,N'*-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEM), or (ii) methacrylic acid (AMA) and 2-methacryloyloxybenzoic acid (MAOB) as anionic monomers. Also be used to polyethylene glycol methacrylate (PEGMA) as a stabilizing agent.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La tecnología de liberación controlada de fármacos ha tratado de resolver uno de los principales problemas que se han observado en la forma tradicional de liberación: la baja sincronización entre el tiempo necesario para ejercer el efecto terapéutico y la disponibilidad en el sitio específico requerido. Por lo tanto, para dirigir al fármaco hasta su sitio de acción, las nuevas tendencias tecnológicas deben satisfacer requerimientos básicos: (i) estructuralmente, una eficiente capacidad de cargado del fármaco y de respuesta a estímulos medioambientales; y (ii) funcionalmente, una eficiente capacidad de protección del fármaco dentro del organismo y de vectorización tejido-específica.

El desarrollo de materiales poliméricos ha permitido el avance de nuevos sistemas de liberación de fármacos, ya que ellos ofrecen una gran posibilidad de combinaciones estructurales y fisicoquímicas que pueden ser configuradas para tal fin. Su principal aplicación farmacéutica consiste en la incorporación de fármacos en mezclas que contienen materiales poliméricos capaces responder (estructuralmente) a estímulos del medio ambiente (p.e. el valor de pH, temperatura o concentración de sales), favoreciendo la liberación inducida del principio activo, en el tejido o compartimiento fisiológico donde se desea que ejerza su efecto terapéutico (Licea et al. 2007). Además, el desarrollo de los llamados “polímeros inteligentes” es quizás el avance más prometedor, ya que existe la posibilidad de diseñarlos para responder a más de un estímulo y optimizarlos para funcionar a escala micro o nanométrica.

Ejemplo de estos polímeros inteligentes son los hidrogeles anfotéricos o anfólicicos; estos son materiales poliméricos que contienen grupos funcionales tanto aniónicos como catiónicos en su estructura. Entre sus propiedades incluyen “hidrofilicidad, buena compatibilidad, propiedades mecánicas moderadamente altas y permeabilidad ajustable a líquidos dependiendo de los tipos de cargas fijas presentes y condiciones de polimerización” (Lugo, 2006). Las primeras aplicaciones sobre este tipo de polímeros como resinas de intercambio iónico para tratamientos de agua residual, desalinización, clarificación o decoloración; también son utilizados en la purificación de proteínas por separación de fase, y estabilizadores para polimerizaciones (Kudaibergenov, 1999).

Sin embargo, la propiedad más importante de los polímeros anfotéricos es su capacidad única de expandirse y mantenerse solubles en presencia de sales en el medio

dispersante, lo que tiene diversos propósitos; por ejemplo, para aplicaciones médicas se requiere de materiales que funcionen en condiciones de fuerza iónica fisiológica. Recientemente, micro-cápsulas anfotéricas han sido diseñadas como sistemas de liberación auto inducido de insulina con sensibilidad a la glucosa (Hoare y Pelton, 2008)

Ya que los polímeros con un solo tipo de grupo ionizable (polielectrolitos) se caracterizan por contraerse en soluciones salinas, el efecto contrario observado en los polianfotéricos se conoce como “comportamiento antipolielelectrolito” (Lugo, 2006).

Otra diferencia entre estos dos sistemas es el tipo de comportamiento que muestran frente a distintos valores de pH: los polielectrolitos muestran cambios en la ionización pero esta ocurre en una sola dirección; en un microgel anfotérico ocurre en ambas. Los dos tipos de grupos ionizables presentes en la misma red se disocian ya sea a valores de pH elevados y otros a valores bajos según corresponda, pero lo hacen en conjunto y dentro de un mismo sistema. En este comportamiento se pueden tener entonces dos puntos de hinchamiento máximos con un punto mínimo de convergencia. A este último se le conoce como punto isoelectrónico (PI) donde las cadenas están unidas lo más posible (Mallika y Kumacheva, 2006; Ogawa et al, 2003)

La investigación en geles inteligentes con doble sensibilidad, en particular a aquellos que muestran sensibilidad a cambios en temperatura y pH, inició en la década de los 1990's; sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en estos geles demanda la solución a dos problemas principales: 1) el bajo valor del grado de hinchamiento (Q) observado cuando se encuentran sales disueltas en el medio, y 2) la baja velocidad de respuesta de la transición de hinchado-colapsado (Lugo et. al. 2007). Para compensar el primer problema, se plantea la posibilidad de utilizar sistemas con propiedades anfotéricas en conjunto con un sistema de gel termosensible. (Lugo et. al. 2007; Kuckling et. al. 2000).

Uno de estos materiales termosensibles ampliamente estudiados son los polímeros del monómero *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) (**Figura 1**), los cuales muestran cambios reversibles en su conformación a una temperatura ~ 32 °C (Kuckling et. al. 2000) en medio acuoso. Considerando que este cambio se muestra cercano a temperaturas fisiológicas, PNIPAAm ha sido uno de los materiales más estudiados en áreas biomédicas, incluyendo

aplicaciones en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos (Kuckling et al. 2000; Kabanov y Vinogradov, 2009; Lu y Ballauf, 2007).

Se ha observado que la incorporación de grupos hidrofílicos aumenta la temperatura de transición de fase de estos microgeles, mientras que la incorporación de grupos hidrofóbicos la decrecen (Chen et. al. 2011; Lugo et. al. 2007). Se ha copolimerizado PNIPAAm con monómeros aniónicos como lo son el ácido metacrílico (AMA) (Brazel y Peppas, 1995) y el ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) (Serrano et. al. 2012); un monómero catiónico muy utilizado también es el *N,N'*-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) (Moselhy et al. 2009). AMA y DMAEM han demostrado tener buenas características de biocompatibilidad en humanos, representando efectos dañino sin relevancia clínica (citado <http://www.chem.unep.ch/>) mientras que MAOB, al ser un derivado del ácido salicílico (Licea A, et. al. 2003), tiene buen potencial como acarreador farmacéutico dentro del organismo (**Figura 2**).

En cuanto al segundo problema, se sabe que la velocidad de respuesta está relacionada de manera importante con la proporción volumen-superficie de un objeto (Vinogradov y Vinogradov, 2009; Serrano et al. 2012) Recientemente, la aplicación de las micro y nanotecnologías ha sido de especial interés para la generación de sistemas de liberación de fármacos debido a la excelente relación que existe entre la superficie y la masa de estos sistemas en comparación con los métodos que utilizan vehículos convencionales, los cuales sobrepasan estas dimensiones (De Jong y Borm, 2008). Esta notable diferencia entre el área superficial y el volumen de la partícula, permite una mejor interacción con el medio, incrementando su capacidad de adsorber y acarrear compuestos (p. e. fármacos y proteínas) favoreciendo así una mayor interacción con superficies.

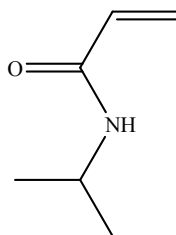


Figura 1. Estructura molecular de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm)

Además, estos sistemas acarreadores pueden incrementar la liberación sitio-específica de fármacos, favoreciendo su absorción por las células blanco y reducir así la toxicidad asociada al fármaco libre en el organismo; y por ende, permitiendo un incremento en el índice terapéutico (Chen et. al. 2011). Para que esto sea posible, es necesario diseñar vehículos, a escala micro y nanométrica, con tiempo de vida media prolongado en el organismo y con capacidad de liberación de fármacos sitio-específica.

Los microgeles y nanogeles inteligentes son redes poliméricas ligeramente entrecruzadas de tamaño micrométrico (diámetro de 0.1 - 1.0 μm) y nanométrico (diámetro $< 0.1 \mu\text{m}$, es decir 100 nm) respectivamente (De Jong y Borm, 2008), capaces de responder a estímulos externos físicos o químicos, tales como temperatura, pH, luz, fuerza iónica, y campos magnéticos, entre otros (Ballauff y Lu, 2007). Sin embargo, una de las propiedades más importantes de estas partículas es su capacidad o grado de hinchamiento (Q) en sistemas acuosos, el cual es controlado principalmente por su estructura (composición química del polímero, grado de entrecruzamiento y densidad de carga del polielectrolito) y las condiciones del medio que las rodean (pH, temperatura y fuerza iónica) (Kabanov y Vinogradov, 2009).

Por otro lado, una vez que las micropartículas hayan alcanzado el torrente sanguíneo (como sería deseable), los mayores impedimentos para que el fármaco sea liberado son: (i) la interacción de estos vehículos con proteínas séricas, resultando en una aglutinación u opsonización, (ii) la retención y eliminación, por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), que se encuentra en el hígado y en el bazo (De Jong y Borm 2008) ó por los glomérulos del riñón, y (iii) la su acumulación en sitios no específicos (Vinogradov y Kabanov, 2009).

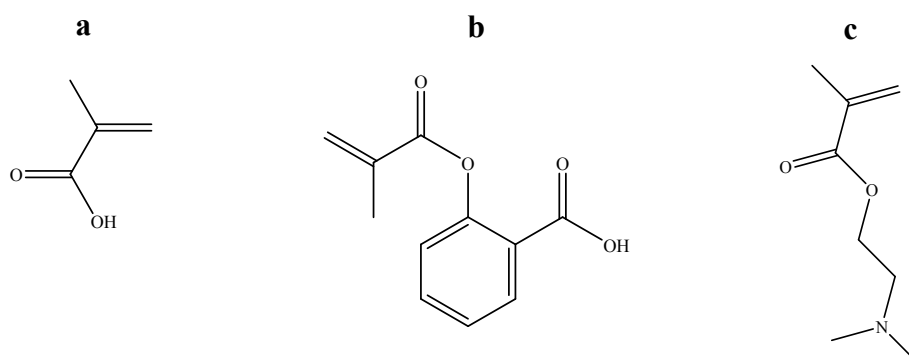


Figura 2. Monómeros iónicos: (a) AMA, (b) MAOB y (c) DMAEM.

Para reducir la interacción con proteínas séricas y extender el tiempo de vida media, la superficie de los micro-vehículos son recubiertos con moléculas hidrofílicas inertes, como el polietilenglicol (PEG). (Vinogradov y Kabanov, 2009; Oishi et. al. 2009; Serrano et. al. 2012).

Un procedimiento en específico, el método de polimerización por radicales libres en emulsión sin tensoactivo es sencillo de desarrollar y de altos rendimientos de polimerización. De acuerdo con Bradley y colaboradores (2009) varios investigadores han preparado microgeles anfotéricos, la mayoría sintetizados por polimerización por dispersión en medio acuoso con uso de tensoactivos. Serrano y colaboradores (2012) desarrollaron un método para la síntesis de nano y microgeles núcleo-coraza con ayuda del polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMEM) como agente emulsificante en la solución de síntesis; la técnica fue hecha en un solo paso y sin el uso de agentes surfactantes. Se sabe que estos últimos son materiales que al ser absorbidos por el gel alteran el balance hidrofílico/hidrofóbico que existe dentro de la red, modificando su capacidad de respuesta al medio ambiente y su purificación resulta difícil (Schmaljohann, 2006).

Por lo anterior expuesto, como diseño de un nuevo tipo de vehículo farmacéutico para la liberación de principios activos dentro del organismo se propone sintetizar microgeles anfotéricos con sensibilidad al pH, fuerza iónica y temperatura mediante la copolimerización de los monómeros DMAEM, AMA, MAOB, NIPAAm y PEGMEM de manera entrecruzada; este último será utilizado como agente estabilizante de cargas durante la reacción de síntesis, además de conferir a las micropartículas características de biocompatibilidad.

I.2 HIPÓTESIS

Es posible sintetizar y caracterizar microgeles con propiedades anfotéricas y termosensibles utilizando NIPAAm, MAOB ó AMA y DMAEM como monómeros aniónicos y catiónicos respectivamente, usando PEGMEM como estabilizante y en un solo paso de síntesis.

I.3 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de liberación fármacos basado en microgeles biocompatibles inteligentes mediante un procedimiento de síntesis de polímeros anfotéricos en ausencia de detergente y en un solo paso.

I.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener microgeles a base de NIPAAm copolimerizada con monómeros ácidos y básicos mediante la técnica de polimerización por dispersión vía radicales libres en ausencia de detergente y en un solo paso.
2. Determinar las características físico-químicas, tamaño y distribución, de los microgeles mediante técnicas analíticas, microscópicas y espectrométricas.
3. Determinar el efecto de la temperatura, pH y concentración de sales sobre las propiedades físicas de los microgeles mediante técnicas analíticas, microscópicas y espectrométricas.

CAPÍTULO II
TEORÍA GENERAL

II.1 LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

De acuerdo con Lee y Robinson (2003), la historia de la tecnología de liberación controlada puede dividirse en tres periodos principales. Desde 1950 hasta 1970 comprende el periodo de liberación sostenida de fármacos. Sistemas a base de polímeros fueron fabricados como formas farmacéuticas con el propósito de obtener niveles sostenidos de fármaco en el organismo, y en consecuencia, la acumulación de este por un periodo prolongado. Sin embargo, no se tenían muchos conocimientos de las barreras fisiológicas y anatómicas en el cuerpo humano, siendo esto un impedimento importante para el desarrollo de sistemas eficientes. El periodo de 1970 a 1990 fue caracterizado debido al enfoque que se dio para determinar las necesidades en la liberación controlada de fármacos y por una mayor comprensión en la fisiología de las diferentes vías de administración. Después de 1990 comienza la era moderna en esta área y representa el periodo en el cual se intenta hacer hincapié en la optimización de las diversas formas de liberación; el *tamaño* y un *recubrimiento biocompatible* se vuelve importante para la vectorización y prolongar el tiempo de vida media del fármaco en circulación sistémica (Bradley et al. 2007; Serrano et al. 2012).

II.1.1 Dispersiones coloidales.

De acuerdo con Schott (2003) se les conoce como dispersiones coloidales a aquellas que tiene por lo menos dos fases separadas, de las cuales una es dispersa (conocida también como fase interna) y la otra es una fase continua (externa), denominada medio de dispersión. Lo que distingue a las dispersiones coloidales de las demás soluciones es el tamaño de las partículas que se encuentran en la fase dispersa.

“Estos sistemas contienen un tipo de solutos (pueden ser más de uno) que poseen por lo menos una dimensión en el rango de los 10 a 100 Å (1 unidad Angstrom = 10^{-8} cm = 10^{-10} m) o 1-10 nanómetros (1 nanómetro = 10^{-9} m) en el extremo inferior de la escala, hasta unos pocos micrómetros (μm) en el extremo superior de la escala ($1 \mu = 104 \text{ \AA} = 10^{-6}$ m)” (Schott, 2003, p.334) . Las principales características de estos tipos de dispersiones son:

- a) Las partículas dispersas no son visibles al microscopio óptico debido a su tamaño, por lo que suelen ser observadas con microscopio electrónico.

- b) Estas partículas pasan a través del papel filtro común, pero pueden ser retenidas por membranas de diálisis o ultrafiltración dependiendo del diámetro de poro.
- c) Las dispersiones coloidales no sedimentan debido al pequeño tamaño de sus partículas; el movimiento browniano las mantiene en suspensión.
- d) Debido a la relación superficie/volumen que existe en estas partículas coloidales, una fracción apreciable de sus átomos, iones o moléculas están localizadas en la capa limitante entre la partícula y el aire (superficie) o entre una partícula y un líquido o sólido (interfase).

El término “coloidal” designa un estado de la materia caracterizado por dimensiones submicroscópicas; cualquier sustancia dispersa con las dimensiones apropiadas puede ser considerado como un coloide (Schott, 2003, p.334).

II.1.2 Dispersiones coloidales en la industria farmacéutica.

Según Schott (2003), la mayoría de los líquidos dispersos de importancia farmacéutica son acuosos (jarabes, soluciones inyectables, suspensiones, etc). Los coloides hidrófilos (afines al agua) pueden dividirse en materiales *particulados* y *solubles*. Los últimos son polímeros lineales o ramificados que se disuelven molecularmente en agua y son clasificados como dispersiones coloidales debido a que las moléculas individuales se encuentran dentro de tamaño de los sistemas coloidales por ser mayores de 50 a 100 Å (5 a 10 nm). Las dispersiones coloidales *particuladas* hidrófilas están formadas por sólidos que se hinchan en agua pero que no son capaces de disolverse ni degradarse en iones o moléculas originales, también denominados *hidrogeles* (Schott, 2003).

II.1.3 Hidrogeles

A inicios de la década de los 50's el equipo de los investigadores Wichterle y Lim, propusieron por primera vez el uso de biomateriales con aplicaciones en oftalmología (Kopecek y Yang, 2010). En 1953 Drahoslav Lim sintetizó el primer hidrogel copolimerizando el 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) con dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), trabajo que fue publicado en la revista *Nature* en 1960 (Wichterle y Lim, 1960). Otto Wichterle también pudo observar las propiedades y cualidades de los hidrogeles y preparó los primeros lentes de contacto blandos (Wichterle, 1978). Ambos

materiales mostraron una excelente biocompatibilidad, estabilidad y dureza. Fue el inicio de los biomateriales y el estudio de estos se disparó desde entonces y ha permanecido en continuo crecimiento. Sus aplicaciones son numerosas y de interés en el área biomédica como sistemas de liberación de fármacos e ingeniería de tejidos musculares artificiales, como membranas en sistemas de separaciones químicas y en la fabricación de lentes de contacto (Hoffman, 2002; Peppas et al. 2000; Qiu et al. 2001).

Los hidrogeles se utilizan como matrices para las formulaciones de liberación prolongada. Pueden encontrarse hidrogeles en diversas formas físicas dependiendo la aplicación para la cual fueron diseñados: (a) formas sólidas moldeadas (p. e. lentes de contacto blandos), (b) matrices de polvo presurizado (tabletas o cápsulas para ingestión oral), (c) micropartículas (acarreadores de fármacos, **Figura 3**), (d) recubrimientos (implantes, catéteres, comprimidos ó capsulas), (e) membranas o láminas (como reservorio de fármacos en parches), (f) sólidos encapsulados (bombas osmóticas) y (g) líquidos (Hoffman, 2002).

Los hidrogeles son redes de alto peso molecular tridimensionales compuestos por una cadena principal polimérica, agua y un agente entrecruzante (**Figura 4**). Este entrecruzamiento puede estar dado por enlaces de tipo covalente, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals o enredos físicos (Kamath y Park, 1993; Park y Park, 1999). Son materiales poliméricos que no pueden ser desintegrados en agua a temperatura y pH fisiológico; pero sí podrían ser capaces de absorber agua si se incluyeran grupos funcionales hidrofílicos dentro de la estructura química de la red polimérica; como lo pueden ser $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$ y SO_3H (Coelho et. al. 2010).

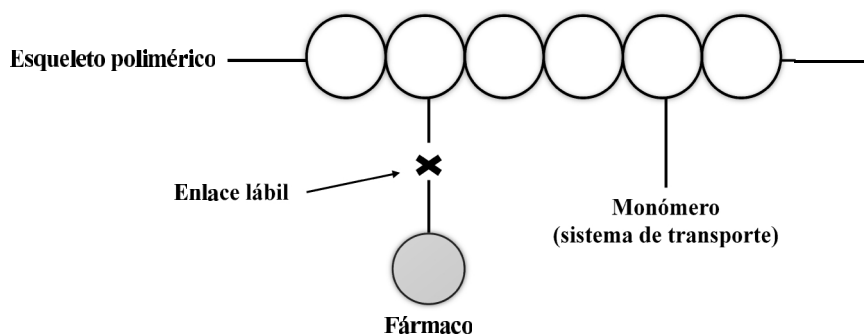


Figura 3. Polímeros como vehículos de fármacos.

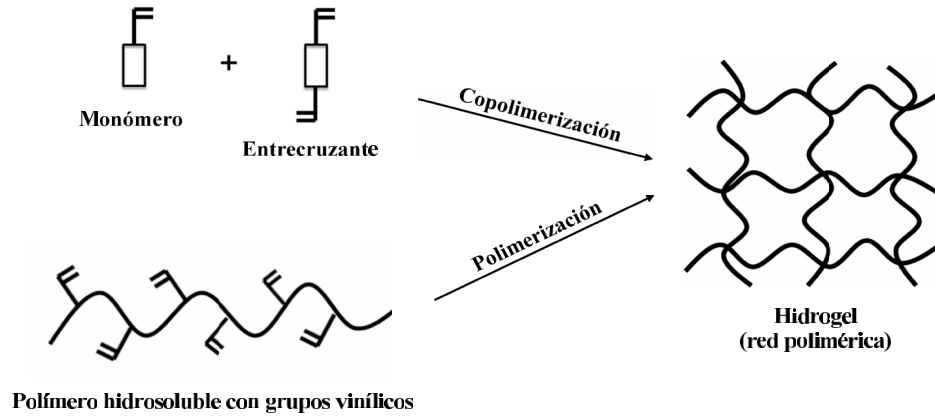


Figura 4. Método de síntesis de hidrogeles y estructura final.

La importancia de estos hidrogeles radica en que pueden absorber grandes volúmenes de agua en relación a su volumen debido al enorme espacio libre que existe entre cada una de las cadenas que conforman la red (**Figura 4**).

Tabla 1. Criterios y clasificación de hidrogeles.

Criterio	Clasificación
Origen	Naturales
	Sintéticos
Contenido de agua	Hinchamiento bajo
	Hinchamiento medio
	Hinchamiento alto
Porosidad	No poroso
	Microporoso
	Macroporoso
	Superporoso
Entrecruzamiento	Químico (o covalente)
	Físico (o no covalente)
Biodegradación	Biodegradable
	No biodegradable

Otra característica importante sería que, dependiendo del grado de entrecruzamiento de las cadenas, estos materiales pueden tener cierto grado de elasticidad, dureza y suavidad, propiedades físicas que pueden llegar a ser importantes para la calidad del mismo (Coelho et al. 2010). Los hidrogeles pueden ser clasificados de acuerdo a diversos criterios. Se muestran los más importantes en la **Tabla 1** (Coelho et. al. 2010; Chang et. al. 2010; Kopecek y Yang, 2007). Recientemente se han realizado muchos esfuerzos para el desarrollo de polímeros biocompatibles en escala del rango micrométrico y nanométrico, buscando características que mimeticen lo mejor posible las dimensiones y condiciones de las partículas que se encuentran de manera natural en torrente sanguíneo; esto con el fin de no ser depurado del organismo o atacado por el sistema inmunológico. El constante desarrollo ha permitido una mejora continua hasta llegar a lo que conocemos hoy en día como materiales de “estímulo-respuesta” ó polímeros “inteligentes”.

II.2 POLÍMEROS INTELIGENTES

Los polímeros inteligentes son materiales que pueden tener una transición o sufrir un cambio estructural abrupto a pequeñas variaciones en el medio que los rodea, como lo pueden ser: temperatura, pH, carga eléctrica, fuerza iónica, radiación electromagnética, luz, entre otros (**Figura 5**). Estos cambios pueden ser fenómenos de desintegración, liberación de fármaco, hinchamiento/colapso, disolución/precipitación, etc. (Coelho et. al. 2010; Qiu y Park 2001). En la **Tabla 2** se muestran diferentes tipos de estímulos de ciertos polímeros.

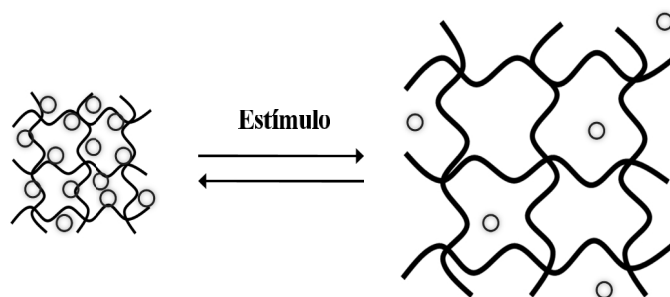


Figura 5. Representación esquemática de la liberación de un fármaco a partir de una matriz estímulo-respuesta.

A pesar de que los diversos estímulos antes mencionados han sido ampliamente estudiados, los más reportados en la literatura están relacionados con la temperatura y el pH (Geever et. al. 2007; Ballauf y Lu, 2007; Kabanov y Vinogradov, 2009). La razón principal se debe al hecho que en el cuerpo humano existen compartimentos con diferente valor de pH y si bien la temperatura es muy estable en una persona sana, en una enfermedad (fiebre, infecciones locales, inflamaciones, entre otros) esta aumenta por encima de la temperatura corporal.

Estas condiciones que se desvían de la normalidad pueden ser aprovechadas como estímulos para inducir transiciones de fase en este tipo de materiales poliméricos, los cuales responden a pequeños cambios en el ambiente con significantes cambios en sus propiedades físico-químicas, característica que puede permitir liberar un fármaco o atrapar algún metabolito, por ejemplo.

Tabla 2. *Polímeros inteligentes y los tipos de estímulos que inducen transición (adaptación de Ahn et. al. 2008; Roy y Gupta, 2003)*

Polímero	Tipo de estímulo
Bisacrilamida	pH
Poli(acido acrílico)	pH
Quitosan	pH
Poli(acrilamidas)	pH
Poli(acrilato de butilo)	pH
Poli(oxido de etileno)	Temperatura
Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)	Temperatura
Poli(dimetilsiloxano)	Eléctrico, temperatura
Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida- <i>co</i> -acrilamida) con materiales ferromagnéticos	Magnético, temperatura
Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactona)	Temperatura, pH

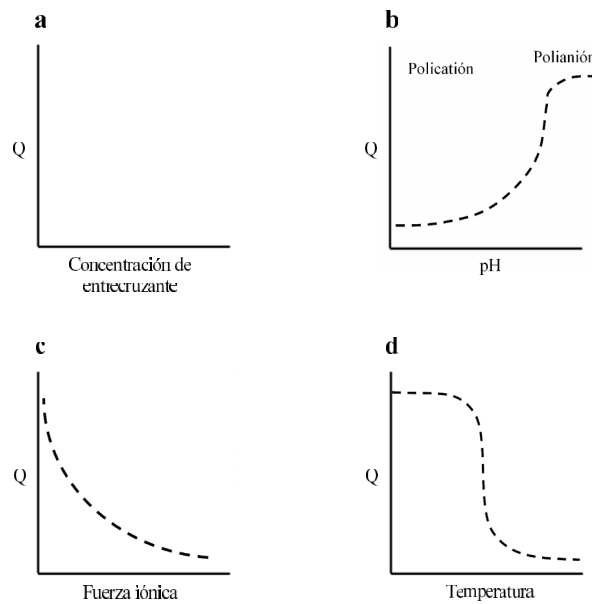


Figura 6. Factores que afectan Q en los microgeles. (Adaptación de Kabanov y Vinogradov, 2009).

El hinchamiento y el colapso de hidrogeles son propiedades que permiten optimizar el cargado y la liberación de fármacos (Serrano, 2011). El hinchamiento de los microgeles en medio acuoso es controlado por: 1) la estructura de la red (composición química del polímero, grado de entrecruzamiento y la densidad de carga por parte de los monómeros iónicos polimerizados en la red) y 2) los parámetros del medio que rodea al hidrogel como lo son el pH, fuerza iónica, temperatura, etc. (Kabanov y Vinogradov, 2009).

La forma en cómo estos afectan el comportamiento se muestran en la **Figura 6**. Según Kabanov y Vinogradov (2009), el aumento en la concentración del entrecruzante disminuye Q (**Figura 6**, inciso a); un incremento o decremento en el pH, resulta en el colapso de los hidrogeles compuestos por ácido o bases débiles (inciso b); el incremento en la fuerza iónica disminuye Q en geles polielectrolitos (inciso c) y el comportamiento de hidrogeles compuestos por polímeros termosensibles con LCST, donde el tamaño cae drásticamente cuando la temperatura alcanza este valor (inciso d)

II.2.1 Polímeros sensibles a la temperatura

Los hidrogeles termosensibles son por mucho, el tipo de polímeros inteligentes más estudiados para el diseño de sistemas de liberación de fármacos (Coelho et. al., 2010) sobre todo los que son diseñados a base de acrilamidas *N*-sustituidas.

Una característica que comparten en común estos monómeros es la presencia de una fracción hidrofóbica en su estructura molecular como lo son los grupos metilo, etilo y propilo (Qiu y Park, 2001).

Los polímeros termo-sensibles tienen una temperatura a la cual exhiben un cambio de separación de fase con un consecuente cambio en el volumen del polímero, fenómeno descubierto por primera vez por el investigador Toyochi Tanaka en 1980 (Osada y Kangi, 2001). Este hinchamiento puede ser aprovechado para cargar y/o liberar algún metabolito en el interior de la red polimérica en respuesta a la temperatura del medio que rodea al polímero.

II.2.1.1 Temperatura crítica inferior de solución

Muchos polímeros aumentan su solubilidad a medida que aumenta la temperatura del medio de disolución lo que es conocido como *temperatura crítica superior de solución* (UCST por sus siglas en inglés) (Schmaljohann, 2006) (**Figura 7**, zona b). Si la temperatura disminuye por debajo de la UCST, el sistema exhibe una transición de fase y el soluto precipita (zona a).

Sin embargo, existen polímeros que en soluciones acuosas muestran un comportamiento opuesto, es decir, disminuye esta solubilidad a medida que la temperatura aumenta y cuando ésta se encuentra más allá de cierto punto, conocido como *temperatura crítica inferior de solución* (LSCT por sus siglas en inglés) (Qiu y Park, 2001) existe una nueva separación de fase (zona c). Estos sistemas no están restringidos a medio acuosos solamente, pero solo estos son de interés en el área biomédica.

Debido a que los hidrogeles no pueden disolverse literalmente, este cambio de fase se traduce en su capacidad de hinchar ($< LCST$) y colapsar ($> LCST$) su red como resultado de cambios en la temperatura; este fenómeno es reversible si el entrecruzamiento de la red está dado por enlaces covalentes (Qiu y Park 2001). Si el medio que rodea al hidrogel es agua, entonces este comportamiento se puede traducir libremente en un efecto de hidratación-deshidratación respectivamente. De acuerdo con Peppas y colaboradores, estos geles también se clasifican de acuerdo a su termosensibilidad, la cual puede ser negativa (LCST) o positiva (UCST) (Peppas et. al., 2000).

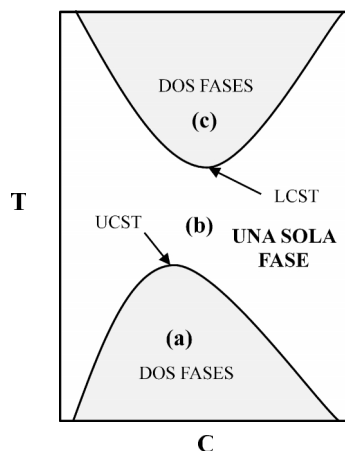


Figura 7. Diagrama de fases de un sistema polímero-disolvente a presión constante (adaptación de Lugo, 2006).

La transición de estos geles es una condensación de tipo líquido-gas y es el resultado de una competencia entre fuerzas de repulsión y atracción que compiten entre los monómeros de la red en solución, es decir, le confieren propiedades de elasticidad e hinchamiento de origen osmótico (Takeoka et. al, 1999). Otras contribuciones importantes que interfieren son los puentes de hidrogeno que la red es capaz de formar con el agua; las fuerzas hidrofóbicas entre las distintas regiones del hidrogel, interacciones de van der Waals y los enlaces de tipo iónico que conllevan presión osmótica debido a los contra-iones en solución (Bradley et. al., 2005).

Tabla 3. *Polímeros con LCST en soluciones acuosas con potencial para aplicaciones biológicas (adaptación de tesis doctoral de Salgado, 2003)*

Polímero	LCST (°C)
Poli(<i>N</i> -isopropilmetacrilamida) (PNIPMAm)	39-47
Poli(<i>N</i> -vinilisobutiramida) (PNVIBAm)	40
Poli (<i>N</i> -vinilcaprolactama) (PNVCL)	32-35
Poli(silamina)	37
Poli(éter metil vinílico) (PVEM)	33-40
Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) (PNIPAAm)	32
Poli(<i>N,N</i> -dietilacrilamida) (PDEAAm)	25-32

La LCST de un polímero determinado puede ser modificada al ser copolimerizado con componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, que pueden incrementar o disminuir esta temperatura respectivamente (Kawaguchi, 2010). En la **Tabla 3** se muestran algunos polímeros con LCST y la temperatura a la cual sucede el cambio de fase.

II.2.1.2 Métodos analíticos para determinar la LCST

Según describe Lugo (2006), la separación de fase de estos polímeros puede ser estudiada por diferentes técnicas experimentales las cuales incluyen: espectroscopia de infrarrojo y mediciones de pH, espectroscopia de RMN-H, viscosimetría, calorimetría, turbidimetría de UV y observación visual (cuando es posible) de la separación de fases.

En el caso de micro y nanogeles, el tamaño suele ser medido con equipos ópticos capaces de leer el movimiento a pequeña escala. Dependiendo de las condiciones del medio dispersante, la velocidad con la que las partículas en suspensión se mueven está muy relacionada con su tamaño. Para estos suele usarse técnicas que midan la dispersión de luz que estas partículas son capaces de emitir una vez que se les incide un rayo de luz, para luego ser detectado e interpretado por equipos especiales mediante la aplicación de ciertas ecuaciones matemáticas.

II.2.1.3 NIPAAm, un material termosensible.

Estudios sobre hidrogeles a base de NIPAAm son ejemplo típicos del impacto y la importancia que puede tener este monómero como vehículo farmacéutico. Este monómero es quizás el más estudiado entre los materiales termosensibles que existen hasta el día de hoy y la razón principal es que su LCST de 32° (en medio acuoso) está muy cercana a la temperatura fisiológica humana y es independiente del peso molecular del polímero o de la concentración de NIPAAm en la red (Fujishige et. al. 1989). El primer reporte de la LCST de PNIPAAm data de 1967 por Scarpa y colaboradores (Scarpa et. al. 1967); desde entonces su transición de fase es bien conocida debido a numerosos estudios.

La estructura química de una red compuesta a base de este material puede ser fácilmente modificada para que la transición no ocurra a los 32 °C sino por encima de los 36°C, condición que se presenta en diversos cuadros patológicos, incluyendo cáncer.

Este material puede hincharse por debajo de su LCST, y colapsar por encima de la misma. Pelton y colaboradores sintetizaron los primeros microgeles termosensibles (Chen et. al 2011; Ballauf y Lu, 2007). Los geles a base de NIPAAm entrecruzada con MBA, mostraron cambios drásticos en el tamaño de partícula, densidad de carga superficial y contenido de agua, cuando éstos se encontraban a temperatura cercana a los valores fisiológicos.

A temperaturas menores a su LCST, las cadenas de PNIPAAm son solubles en medio acuoso, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y sus cadenas laterales (Chen et. al 2011) (**Figura 8**).

El cambio de fase de PNIPAAm puede ser explicado mediante modelos termodinámicos. Este fenómeno se puede observar como un decremento en la entropía (ΔS_{Mezcla} negativo); sin embargo, conforme la temperatura aumenta, el polímero experimenta un cambio de fase y volumen; es decir, la entropía domina sobre la entalpía exotérmica (ΔH_{Mezcla}) de los puentes de hidrógeno formados. Por lo tanto, el cambio de energía libre total ($\Delta G_{Mezcla} = \Delta H_{Mezcla} - T\Delta S_{Mezcla}$) es positiva, con la consecuente separación de fases. Si la concentración del polímero es suficientemente alta, este precipita en la solución (Kuckling et. al. 2000) y el agua es expulsada del microgel, resultando en un drástico decremento en el volumen cuando la temperatura se encuentra por encima de la LCST del polímero (Chen et. al. 2011; Hirotsu et. al. 1987; Kuckling et. al 2000).

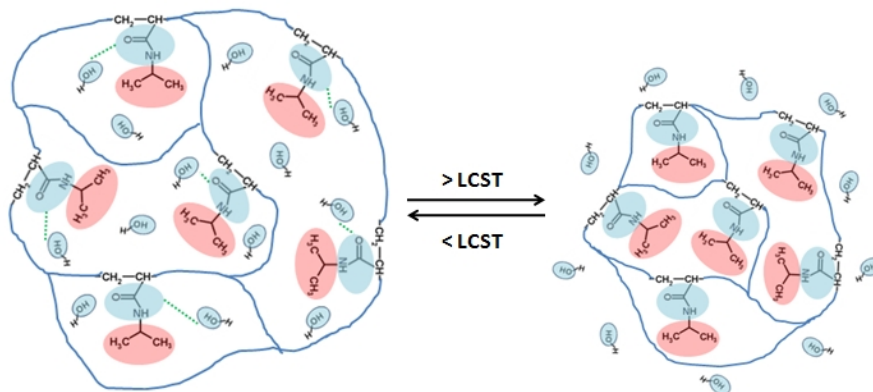


Figura 8. Representación esquemática de la transición del volumen de PNIPAAm en solución acuosa (adaptación de Chen et. al 2011).

II.2.2 Materiales sensibles al pH

Los cambios en el pH dentro del cuerpo pueden ser utilizados como un inductor de respuesta debido que diferentes órganos y tejidos tienen diferentes valores de pH. Como se muestra en la **Tabla 4**. La presencia de ácidos o bases débiles ionizables como parte de la cadena polimérica del material es la clave para la sensibilidad al pH ya que estos son capaces de aceptar o donar protones dependiendo de la acidez o basicidad del medio que rodea al gel. A estos materiales se les conoce comúnmente como *Polielectrolitos* (Qiu y Park, 2001) cuando tiene un solo tipo de carga en la red, que puede provenir de un ácido o bien de una base. Cuando están presentes ambos grupos, estos polímeros son conocidos como *polianfolitos*.

II.2.2.1 Polielectrolitos

Cuando estos grupos pendientes están ionizados, la cadena se extiende en respuesta a las repulsiones electrostáticas por las cargas que fueron formadas, las cuales pueden ser aniones o cationes (Coelho et. al. 2010; Qiu y Park 2001). Schmaljohann y colaboradores demostró que el grado de ionización de estos materiales depende de la concentración de los grupos pendientes ácidos o básicos (Schmaljohann, 2006).

Para obtener estos materiales, se utilizan normalmente monómeros como el ácido acrílico (AA), ácido metacrílico (AMA), anhídrido maléico (AM) y *N,N'*-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) (Kawaguchi, 2010).

Tabla 4. Valores de pH en los distintos compartimentos del cuerpo (adaptado de Schmaljohann, 2006).

Tejido/órgano	pH
Sangre	7.35 - 7.45
Estómago	1.0-3.0
Duodeno	4.8-8.2
Colon	7.0-7.5
Lisosoma	4.5-5.0
Tumor	6.5-7.2

La hidrofobicidad será particular de cada sistema dependiendo de los monómeros ionizables introducidos, lo que implica que dos polímeros con diferentes grupos ácidos tengan diferente comportamiento frente a un mismo valor de pH con fuerza iónica determinada (Qiu y Park, 2001). El AMA ha sido utilizado como inductor de respuesta en polímeros (Vijay et. al. 2010). El grupo carboxílico pendiente de la cadena, acepta protones a bajos valores de pH y los cede cuando el pH del medio supera el valor de su pK_a ; por lo tanto, los hidrogeles sintetizados con este sistema exhibirá un incremento en su volumen hidrodinámico y en la capacidad de hinchamiento cuando estos monómeros pasan de su estado ionizado a no ionizado (**Figura 9**). En MAOB también ha sido observado este efecto (Serrano et al.2012). Cuando se utiliza un monómero básico como el DMAEM, ocurre el mismo efecto pero la ionización ocurre a valores de pH por debajo de su pK_a . Los hidrogeles hechos a base PAMA y copolimerizado con PEG tienen comportamientos únicos a cambios en el pH (Peppas y Klier, 1991). A valores bajos de pH, los protones del grupo del carboxilo del PAMA) interactúan con el grupo éter de la molécula de PEG a través de puentes de hidrogeno; esas uniones provocan una reducción del tamaño de los hidrogeles al no permitir un libre movimiento entre las cadenas y expansión de las mismas.

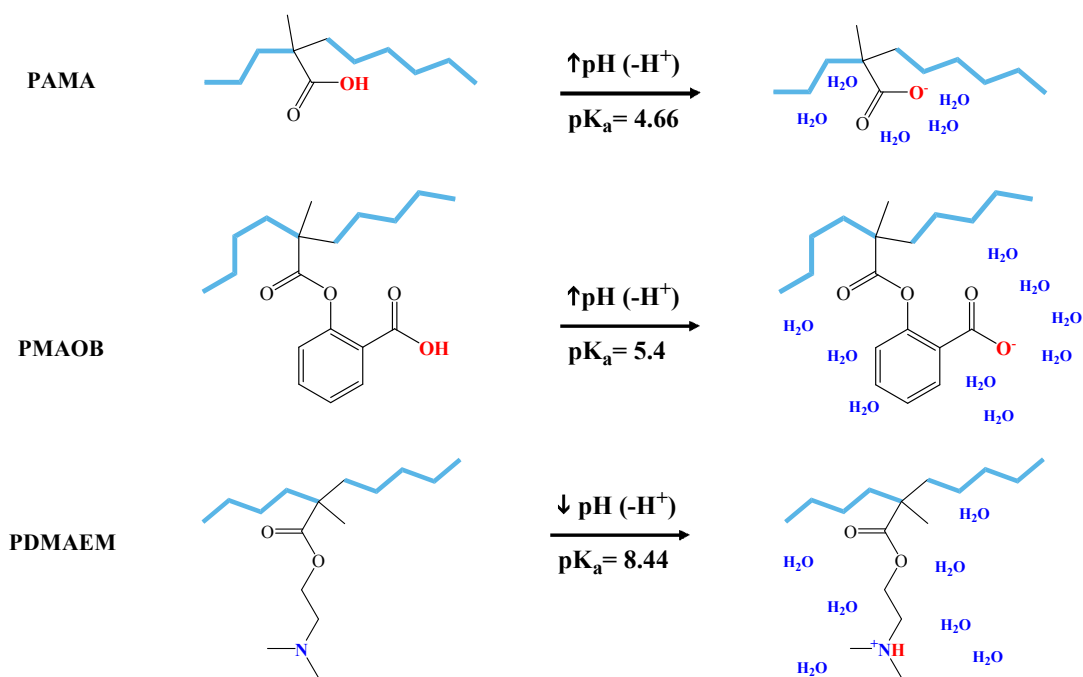


Figura 9. Representación esquemática de la sensibilidad al pH de PAMA, PMAOB y PDMAEM (los valores de pK_a mostrados son de los monómeros).

A medida que aumenta el pH del medio, el grupo carboxilo del AMA es ionizado, se rompen los puentes de hidrogeno y se lleva a cabo la separación de las cadenas antes unidas, lo que conlleva a un hinchamiento del hidrogel.

II.2.2.2 Polianfolitos

Las fuerzas electrostáticas que actúan en los polielectrolitos también están presentes en los microgeles polianfolitos; sin embargo, estas interacciones se dan de forma distinta. Cuando un cambio en el pH lleva a la ionización de un grupo ácido o básico, las repulsiones entre las cargas iguales llevan a que las cadenas se separen, con resultado en un tamaño de partícula mayor (**Figura 10**).

A valores bajos de pH , el hinchamiento se incrementa debido a la repulsión entre las cargas positivas de los grupos básicos protonados, mientras que a valores elevados de pH la causa es la repulsión entre las especies negativas provenientes del ácido (Mahltig et al 2010) (**Figura 11; a**). Sin embargo, no solo la contribución de las fuerzas electrostáticas afecta el hinchamiento (atracción y repulsión de cargas), sino también la contribución por parte de la presión osmótica que el agua ejerce en el interior del microgel. El agua es un disolvente polar y las cargas vuelven al microgel también una macromolécula altamente polar (dependiendo del número de grupos ionizables), por lo que el agua “disuelve” o hidrata fácilmente al hidrogel y ocurre el hinchamiento.

Existe una región en esta transición de los compuestos anfotéricos (o anfotéricos) en donde conforme aumenta o disminuye el valor del pH, las cargas tanto negativas como positivas de los monómeros son neutralizadas respectivamente y la fuerza de repulsión de cargas entre cargas opuestas es mínima; esto vuelve al microgel una molécula mas apolar, por lo que la contribución de la presión osmótica que el agua puede ejercer en el interior del hidrogel es menor para que ocurra el hinchamiento.

Entonces el encogimiento de red es mayor traduciéndose en una reducción de tamaño; a este punto de valor de pH es conocido como *punto isoeléctrico* (PI) (**Figura 11; a**). El PI puede ser definido entonces como el punto donde la carga de la carga neta es igual a cero; en este punto se forman puentes inter e intra salinos entre segmentos cargados de las macromoléculas (Wen y Stevenson, 1993) (**Figura 10**).

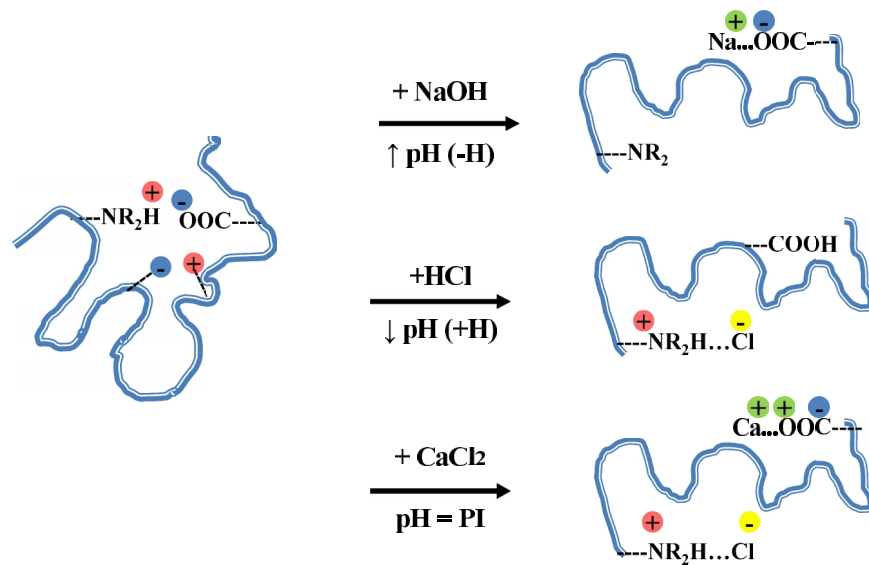


Figura 10. Comportamiento de un polímero anfotérico balanceados en solución (adaptación de Tesis doctoral de Lugo, 2006)

Los hidrogeles polianfolíticos pueden ser sintetizados en forma balanceada (igual número de cargas positivas y negativas), o en forma desbalanceada (exceso de cargas positivas o negativas) (Lugo, 2006). Los hidrogeles polianfolitos balanceados colapsan a bajas concentraciones de sales disueltas y se hinchan a altas concentraciones de éstas; además cuando están en cantidades iguales exhiben un hinchamiento a bajos y altos valores de pH de forma casi simétrica (Das y Kumacheva 2006) (**Figura 11; a y b**) y el PI se encuentra cercano al valor promedio del valor de pK_a de ambos grupos ionizables (Bradley, 2007).

Sin embargo, cuando los microgeles anfotéricos tienen un exceso ya sea de grupos catiónicos o aniónicos en la red muestran un valor de Q dependiente de pH muy parecido a los exhibidos por los polielectrolitos (**Figura 12; a y b**) y su hinchamiento disminuye cuando se incrementa la concentración de sal (Lugo, 2006). El PI dependerá también de la concentración de ácido o base en la red (**Figura 12**); un microgel con exceso de grupos ácidos muestra un mayor comportamiento poli-aniónico (**Figura 12; a**) mientras que el exceso de elementos básicos tiene mayor tendencia poli-catiónica (**Figura 12; b**) por lo que el PI cae más hacia la región del pK_a del grupo ionizable que está en mayor proporción.

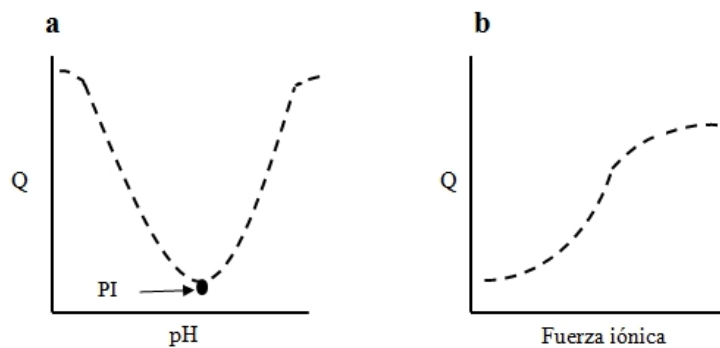


Figura 11. Comportamiento de Q de microgeles anfotéricos balanceados.

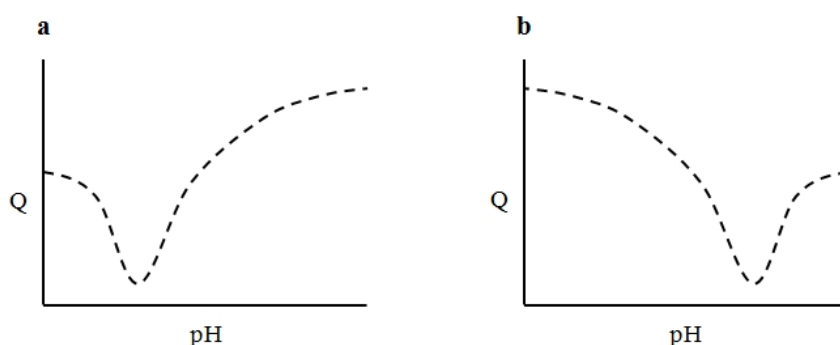


Figura 12. Comportamiento de Q en hidrogeles anfotéricos desbalanceados respecto al pH.

II.2.3 Materiales sensibles a la temperatura y al pH.

La investigación de geles inteligentes con respuesta a la temperatura y al pH comienza en la década de los 90's (Park y Hoffman 1992; Sassi et. al 1996); no obstante, ya en 1987, Tanaka y colaboradores habían copolimerizado NIPAAm con componentes iónicos y observaron la transición de estos hidrogeles (Hirotu S, et. al. 1987).

La combinación de monómeros termosensibles como NIPAAm y de monómeros sensibles al pH como los mencionados en el apartado anterior, permite la síntesis de copolímeros con doble respuesta (Dong y Hoffman, 1991). Ambos sistemas pueden tener aplicaciones potenciales para el desarrollo de nuevas terapias contra cáncer por ejemplo, y poder de alguna manera vectorizar fármacos antineoplásicos en estos tumores, ya que la zona donde se desarrolla el tumor tiene un pH ligeramente menor al fisiológico y una temperatura por encima de la corporal debido al elevado metabolismo de estas células malignas.

Ogawa y colaboradores reportaron el resultado de un estudio realizado a microgeles anfotéricos copolimerizados con NIPAAm y observaron los cambios a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de sales disueltas en el medio de dispersión (Ogawa et. al 2003). Los autores no reportaron un cambio apreciable en el tamaño de las partículas característico de un polímero anfotérico. No obstante, observaron un incremento en la estabilidad de los microgeles con cantidades equivalentes de ácido y base en soluciones salinas, en comparación con la estabilidad observada en agua destilada. Contrariamente, los microgeles anfotéricos con cantidades desiguales de ácido y base mostraron una mayor estabilidad en agua destilada, pero también hubo formación de agregados a altas en soluciones con fuerza iónica elevada.

Los autores atribuyen estos resultados a que no solo existen interacciones de tipo electrostático, puentes de hidrogeno y asociaciones hidrofóbicas *dentro* de la red del microgel (uniones intra-partícula), sino que estas pueden existir *fuera* de ella y formar interacciones de diversos tipos con otras partículas (uniones inter-partículas).

II.3 TAMAÑO DE PARTÍCULA

Los hidrogeles pueden ser clasificados de muchas formas, y una de ellas es de acuerdo al tamaño, dividiéndolos en macrogeles, microgeles y nanogeles (Kawaguchi 2010). Las dimensiones de los microgeles se encuentran en el rango de 0.1 - 1.0 μm , mientras que la de los nanogeles están por debajo de 0.1 μm (De Jong y Borm, 2008). Ambas pueden ser consideradas como dispersiones coloidales las cuales se encuentran dentro de los tamaños mencionados en la primera parte de esta escritura.

El tamaño es una característica importante que influye de manera determinante en el modo y tiempo de respuesta. El área superficial es inversamente proporcional al diámetro de una partícula, de modo que cualquier respuesta por parte de estos materiales sensibles al medio se ve favorecida entre menor es su tamaño al reducir el tiempo de respuesta y quizás volverlos más eficientes. Sin embargo, si la partícula es muy pequeña puede causar problemas (deficiencia en la relación volumen/cargado de fármaco, fácil depuración del cuerpo por parte de riñón, entre otros) lo que puede volver a los microgeles una mejor opción que los hidrogeles en escala nanométrica.

Partículas con dimensiones por debajo de los 200 nm facilitan la entrada de estos microgeles por endocitosis a través de las membranas celulares (Oh et. al. 2008) además de reducir la captura de estas partículas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM); en consecuencia, esto incrementaría el tiempo de circulación dentro del organismo. (Seymour et. al. 1987).

Los microgeles tienen un merito adicional: su tamaño se encuentra en el mismo rango que la longitud de onda que la luz visible. Esta única característica permite a estas partículas sean aplicadas en dispositivos ópticos (Kawaguchi, 2010). El tamaño de las partículas comúnmente es medida por técnicas de ópticas, como la *dispersión de luz dinámica* (DLS por sus siglas en inglés), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones (PCS por sus siglas en ingles) (Zetasizer nano series user manual, 2008).

II.3.1 Determinación del tamaño de partícula por técnicas de DLS

La técnica de DLS (ó PCS) mide el movimiento browniano de las partículas y relaciona este parámetro con su tamaño. Un sistema típico de DLS consta de 6 componentes (**Figura 13**).

Primero se hace incidir un haz de luz mediante un *láser* (**Figura 13, 1**) sobre una *celda* (**2**) que contiene a las partículas en suspensión (la fuente debe ser estrictamente monocromática y de longitud de onda bien definida). La mayoría de la luz pasa a través de la muestra, pero parte de ella es dispersada por las partículas para ser captadas por un *detector* (**3**) que mide la intensidad de estos rayos esparcidos. Según la teoría, la luz es irradiada en todas direcciones por lo que es posible colocar detectores en cualquier posición y este será capaz de captar la luz. Sin embargo, este haz se hace más visible cuando se observa sobre un fondo oscuro y perpendicular al haz incidente; hay equipos que colocan sus detectores en ángulos de 90° y 173° (Zetasizer nano series user manual, 2008). La intensidad con la que la luz es dispersada debe estar en un rango específico para que el detector sea capaz de hacer la medición de manera correcta; si la luz es muy intensa, el detector puede “sobrecargarse”. Para evitar esto, el *atenuador* (**4**) reduce la potencia del rayo láser y en consecuencia, la intensidad de la luz que será dispersada por las partículas. La señal de la luz irradiada pasa entonces del detector a una plataforma para procesar de

manera digital las señales recibidas de éste, llamado *correlador* (5). La función del correlador es comparar la intensidad de la luz (longitud de onda) dispersada, en intervalos de tiempo sucesivos para obtener la velocidad con la que la intensidad está variando, información que es interpretada en un *ordenador* (6) mediante la aplicación de la ecuación *Stokes-Einstein*.

II.3.2 Movimiento Browniano

Durante el fenómeno de dispersión óptica se pueden o no modificar propiedades de la luz dispersada, como la longitud de onda. Según Schott (2003), el desplazamiento en las longitudes de onda, se usa para determinar la velocidad con la que las partículas se mueven en solución para después poder calcular el coeficiente de difusión (D) de éstas. Esto permite conocer el radio de las partículas a través de la ecuación *Stokes-Einstein*.

De acuerdo con el autor anterior, D es una medida de la movilidad de una molécula disuelta o una partícula suspendida en un medio líquido. Las moléculas más pequeñas se desplazan más rápidamente, dependiendo de la afinidad de estas partículas con el medio dispersante. “Las moléculas de soluto y las partículas coloidales suspendidas efectúan movimiento browniano de rotación y de traslación”.

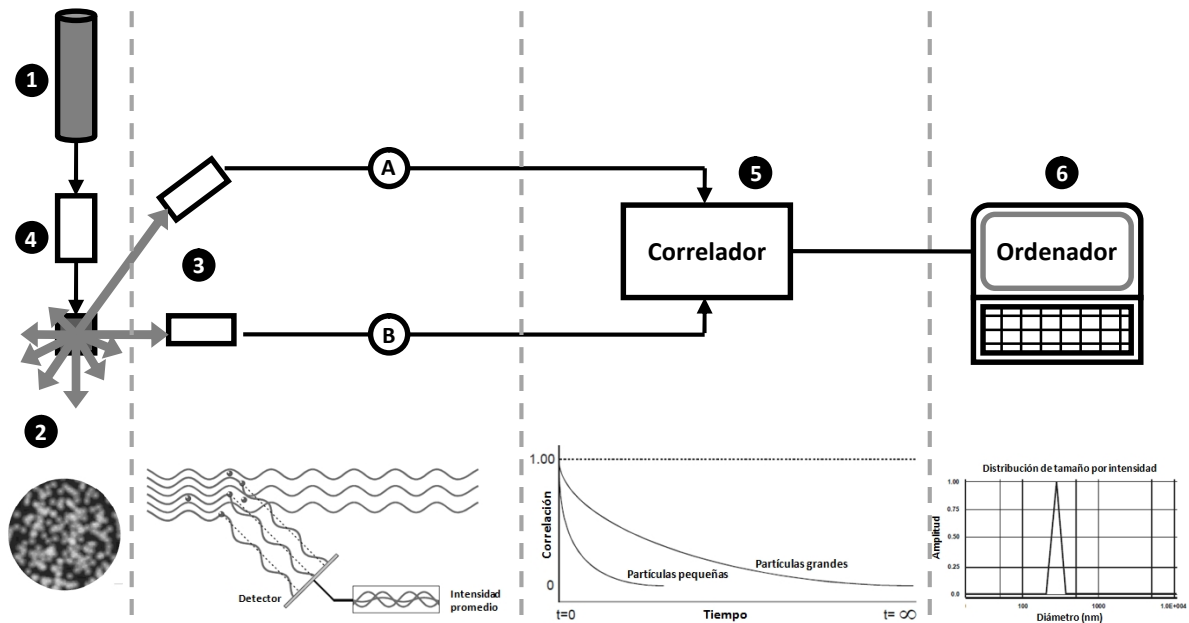


Figura 13. Componentes de un sistema de DLS.

El autor comenta que “para el último, Einstein obtuvo la siguiente ecuación, donde \bar{x} es el desplazamiento medio en la dirección x en el tiempo t y D es el coeficiente de difusión” (Schott, 2003 p.345)

$$\bar{x} = \sqrt{2Dt}$$

Einstein también demostró que, para las partículas esféricas de radio r y bajo condiciones específicas, la velocidad del movimiento depende directamente del tamaño de las partículas y relaciona la formula anterior con una nueva ecuación conocida como Ley de Stokes-Einstein;

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta rN}$$

“La relación entre el tamaño de una partícula y su velocidad debida al movimiento browniano (traslación) está dada por esta expresión, donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, N es el número de Avogadro y η la viscosidad del medio de suspensión” (Schott, 2003 p.345). De acuerdo con el mismo autor, el coeficiente de difusión es una medida de la movilidad de una molécula disuelta o una partícula suspendida en un medio líquido donde las condiciones están determinadas.

La ley de Stokes-Einstein dicta que las moléculas más pequeñas se desplazan más rápidamente y viceversa, dependiendo del medio y de la afinidad de estas partículas con este.

II.4 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE MICROGELES.

De acuerdo con Salgado (2011), los métodos de polimerización pueden ser clasificados de dos maneras: 1) *polimerización por condensación* (o en etapas) y 2) *polimerización por adición* (o en cadena).

“En la polimerización en cadena se utiliza un iniciador para producir especies R^* con un centro reactivo. Este centro puede ser un radical libre, catión o anión. La polimerización ocurre mediante la propagación del centro reactivo por las adiciones sucesivas de un gran número de moléculas de monómero en una reacción en cadena. La

De acuerdo con Kawaguchi (2010), una polimerización acuosa de NIPAAm a 70°C, la solución es homogénea. “Una vez que la polimerización es iniciada, las moléculas de polímero son separadas de la solución donde estaban en disueltas para dar lugar a una fase condensada de nano-agregados de PNIPAAm. Estos nano-agregados comienzan entonces a crecer hasta formar microgeles. El tamaño de estos microgeles es controlado por la composición del medio de polimerización, de la adición de agentes surfactantes y/o comonomeros hidrofílicos, como lo son el AMA, los cuales reducen de manera significativa el tamaño de las partículas” (Kawaguchi, 2010).

La síntesis de microgeles anfotéricos termosensibles de PNIPAAm puede llevarse a cabo por técnicas redox en medio acuoso (Bradley et. al. 2009; Ito et al. 1999; Hoare y Pelton, 2008) ó no acuosos (Deng et. al 2009; Ni H et. al. 2007) y la polimerización puede realizarse usando agentes surfactantes (Hoare y Pelton 2008; Ogawa et. al 2003) ó sin el uso de ellos (Bradley et. al. 2009). Pelton y colaboradores han llevado a cabo la síntesis de microgeles anfotéricos termosensibles con afinidad a la glucosa para la liberación de insulina, copolimerizando NIPAAm con AA y DMAEM mediante el uso del bromuro de cetiltrimetilamonio, un agente tensoactivo (Hoare y Pelton, 2008).

En general, los diámetros de las partículas que son preparadas con agentes surfactantes son más pequeñas (<1 μm) que las obtenidas en sistemas donde no los utilizan (> 1 μm) (Ito S, et. al. 1999). Sin embargo, el uso de agentes tensoactivos iónicos han representado un problema en la industria al no ser fácil de remover una vez que el microgel es sintetizado. Al ser el tensoactivo (o surfactante) un componente de naturaleza iónica, sus cargas pueden fácilmente interaccionar con los grupos ionizables que están copolimerizados en el hidrogel, afectando las propiedades propias del polielectrolito; además, debido la presencia de estos grupos ionizables entre la cadena entrecruzada del polímero también afecta de manera considerable al valor de Q de la red de un polímero termosensible (Ito S, et. al. 1999).

El grupo de Bradley y colaboradores han logrado la síntesis de microgeles anfotéricos en medio acuoso para la captación y liberación de agentes surfactantes (Bradley et. al. 2009). Utilizó los monómeros NIPAAm, DMAEM y al tert-butil metacrilato (tBMA) como molécula precursora del AMA; esto evita el uso de tensoactivo en el medio de dispersión. Otro grupo ha logrado también sintetizar microgeles anfotéricos usando la

Los derivados del PEG son bien conocidos por ser biocompatibles (Kabanov y Vinogradov, 2009). El monómero de PEGMEM además de ser empleado como agente tensoactivo no iónico, también ha sido utilizado como agente de recubrimiento de partículas ya que posee muy buenas características de biocompatibilidad y le confiere a la partícula propiedades de camuflaje dentro del torrente sanguíneo (De Jong y Borm, 2008; Kabanov y Vinogradov, 2009; Bertrand y Leroux, 2012).

CAPÍTULO III
EXPERIMENTAL

III.1 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y SÍNTESIS DE MONÓMEROS

El único monómero sintetizado fue el ácido 2-metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB). Los monómeros vinílicos *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm), *N,N'*-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM), ácido metacrílico (AMA), el entrecruzante *N,N'*-metilenbisacrilamida (MBA) y el iniciador persulfato de amonio (APS por sus siglas en inglés) fueron comprados directamente del fabricante; estos dos últimos a diferencia de los anteriores, no fueron purificados.

III.1.1 Purificación de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm)

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 25g de NIPAAm y se disolvieron en 200 mL de hexano a 45 °C en baño maría. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente con el matraz bien cubierto. Una vez que hubo terminado la formación de cristales, estos fueron filtrados en un embudo de vacío y se lavaron con hexano frío. Se dejaron los cristales de NIPAAm en campana de extracción hasta que el hexano fue volatilizado por completo. La NIPAAm purificada se almacenó en refrigeración (4 °C) hasta su uso (Serrano et. al. 2011).

III.1.2 Purificación del Dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) y del ácido metacrílico (AMA)

Estos compuestos se hicieron pasar por una columna de perlas removedoras de hidroquinona comerciales (Aldrich Co.). Una vez purificados, los monómeros son almacenados a 0 °C hasta su uso en frascos similares a los originales.

III.1.3 Síntesis y purificación del ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB)

La síntesis del MAOB se realizó según la ruta de síntesis ya reportada por Licea y colaboradores (2003) (**Figura 16**). En un baño de hielo, se colocó un matraz bola de tres bocas (250 ml), equipado con un termómetro y una barra magnética. Se disolvieron bajo agitación, 6.91 g (50 mmol) de ácido salicílico y 0.49 g (4 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) en 8.42 ml de trietilamina y 20 ml de diclorometano, esta solución se llevó a 0 °C; posteriormente se adicionó gota a gota 7.50 g (50 mmol) de anhídrido metacrílico.

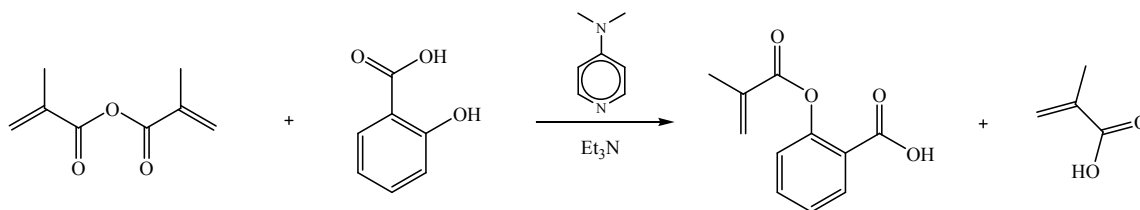


Figura 16. Ruta de síntesis de MAOB

La solución se agitó por 5 horas a 0 °C, siguiendo la agitación a temperatura ambiente por 24 horas. La solución obtenida se lavó 4 veces con 25 mL de HCl 3N y la fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Después de la evaporación, el producto se purificó por re-cristalización con una mezcla de éter de petróleo/éter etílico 70:30. El monómero obtenido se refrigeró hasta su uso.

III.2 SÍNTESIS DE MICROGELES

III.2.1 Síntesis de microgeles termosensibles con MAOB/DMAEM

Se realizó la síntesis de microgeles anfotéricos según el método reportado por Hoare y Pelton (2008) y Serrano (2011). Se utilizó NIPAAm como monómero principal, MBA como entrecruzante y polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMEM) ($M_n = 1:100$) como estabilizante; también fueron necesarios MAOB como monómero aniónico y DMAEM como monómero catiónico. Las proporciones fueron establecidas según reporte en la literatura (Hoare y Pelton, 2008).

Los compuestos fueron diluidos en 50 mL de agua destilada previamente filtrada por membrana con 0.2 micras de poro. Se removió el oxígeno de la mezcla mediante flujo de gas nitrógeno por 30 minutos; después la solución se llevó a baño de aceite hasta alcanzar una estabilidad de temperatura de 70 °C. Las cantidades utilizadas se muestran en la **Tabla 5**. Posteriormente se agregó el iniciador disuelto en 3.335 mL de agua destilada y filtrada a través de poro de 0.2 μm . El tiempo de polimerización fue de 60 minutos; transcurrido este lapso, el matraz fue retirado del baño de aceite, dejándolo enfriar a temperatura ambiente en presencia de oxígeno.

Tabla 5. *Compuestos y concentraciones utilizadas para la síntesis de microgeles anfotéricos MAOB/DMAEM.*

Microgel	PEGMEM (g)	Cantidades añadidas en % mol con respecto al total de moles de NIPAAm.				
		NIPAAm	MAOB	DMAEM	MBA	APS
MAOB 25.4: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	25.4	6.6	2.1	3.5
MAOB 8.1: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	6.6	2.1	3.5
MAOB 16.2: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	16.2	6.6	2.1	3.5
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	13.2	2.1	3.5
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	8.1	2.1	3.5
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	6.6	6.6	2.1	3.5

III.2.2 Síntesis de microgeles termosensibles con AMA/DMAEM

Se realizó la síntesis de microgeles anfotéricos mediante los métodos anteriores (Hoare y Pelton, 2008; Serrano et. al. 2012) pero a una escala menor. Se utilizó NIPAAm como monómero principal, MBA como entrecruzante y PEGMEM ($M_n = 1:100$) como estabilizante; también fueron necesarios AMA como monómero aniónico y DMAEM como monómero catiónico. Los compuestos fueron diluidos en 50 ml de agua destilada previamente filtrada. Las cantidades utilizadas se muestran en la **Tabla 6**. El tiempo de polimerización fue de 60 minutos; transcurrido este lapso, el matraz fue retirado del baño de aceite, dejándolo enfriar a temperatura ambiente en presencia de oxígeno. Las proporciones fueron establecidas según reporte en la literatura (Hoare y Pelton, 2008).

III.2.3 Síntesis de microgeles termosensibles no anfotéricos

La síntesis de microgeles termosensibles sin la presencia de monómeros ya sea catiónicos ó aniónicos se realizó con el fin de observar los cambios que ocurren en la red polimérica cuando no hay presencia de cargas en el copolímero. Sin embargo es importante observar también el cambio que sufre PNIPAAm cuando es copolimerizada con únicamente un tipo de alguno de estos monómeros. Por lo anterior, se sintetizaron y purificaron microgeles con estas características por los métodos ya mencionados (Hoare y Pelton, 2008; Serrano et. al. 2011). Las cantidades añadidas son mostradas en la **Tabla 7**.

Tabla 6. *Compuestos y concentraciones utilizadas para la síntesis de microgeles anfotéricos AMA/DMAEM.*

Microgel	PEGMEM (g)	Cantidades añadidas en % molar con respecto al total de moles de NIPAAm				
		NIPAAm	AMA	DMAEM	MBA	APS
AMA 8.1: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	6.6	2.087	3.535
AMA 16.2: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	16.2	6.6	2.087	3.535
AMA 8.1: DMAEM 13.3	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	13.3	2.087	3.535
AMA 8.1: DMAEM 8.1	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	8.1	2.087	3.535
AMA 6.6: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	6.6	6.6	2.087	3.535

Tabla 7. *Compuestos y concentraciones utilizadas para la síntesis de microgeles control.*

Microgel	PEGMEM (g)	Cantidades añadidas en % molar con respecto al total de moles de NIPAAm					
		NIPAAm	MAOB	AMA	DMAEM	MBA	APS
Ácido 0: DMAEM 0	0.2004	4.13×10^{-3}	0	0	0	2.087	3.535
Ácido 0: DMAEM 6.6	0.2004	4.13×10^{-3}	0	0	6.6	2.087	3.535
MAOB 8.1: DMAEM 0	0.2004	4.13×10^{-3}	8.1	0	0	2.087	3.535
AMA 8.1: DMAEM 0	0.2004	4.13×10^{-3}	0	8.1	0	2.087	3.535

III.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

III.3.1 Identificación de los grupos funcionales de MAOB

Se caracterizó el MAOB sintetizado por espectroscopia IR. Se tomó una muestra del ácido y se disolvió en diclorometano. Una vez disuelto se colocó gota a gota esta disolución en una pastilla de NaCl para IR y se dejó secar a temperatura ambiente. Ya seco se colocó en el equipo de infrarrojo de la compañía PerkinElmer Instruments, modelo. SpectrumOne FT-IR Spectrometer para su lectura.

III.3.2 Determinación del diámetro hidrodinámico (D_h) e índice de polidispersidad (IPD) por la técnica de Dispersión de luz dinámica (DLS)

Este estudio se llevó a cabo para saber si después de la síntesis hay formación de micropartículas y si estos tienen o no el diámetro promedio (D_h) requerido para su aplicación como vehículo farmacéutico, además de conocer la distribución de dichos tamaños. La técnica utilizada para determinar el diámetro de partícula fue mediante la técnica de dispersión de luz dinámica en el equipo Zetasizer Nano ZS modelo ZEN 3500 de la compañía Malvern Instruments (**Figura 17**). Se diluyó la mezcla de síntesis en proporción 1:10 v/v y se colocó 1 mL de esta dilución dentro de una celda de cuarzo perfectamente limpia, procurando que la muestra dentro del contenedor no tenga ninguna burbuja o partículas de polvo, para después ser es colocada en el equipo para su lectura por 10 minutos a una temperatura de 25°C. En caso de obtener un tamaño esperado, la reacción de síntesis fue posteriormente purificada y nuevamente se evaluó su tamaño para observar si hubo o no algún cambio importante en el D_h e IPD.

III.3.3 Purificación de microgeles

Este procedimiento se realizó con el fin de remover todos aquellos componentes que no hayan sido polimerizados y que pudieran afectar los estudios posteriores. Para esto, se utilizaron membranas de diálisis con corte molecular de 12,000-14,000 Da y dentro fueron colocadas las reacciones de síntesis. Una vez selladas la membrana con la reacción en el interior, es colocada contra agua desionizada la cual por gradiente osmótico removerá los componentes dentro de la bolsa sin que los microgeles salgan de la membrana. Se cambió el agua una vez diariamente durante 7 días.

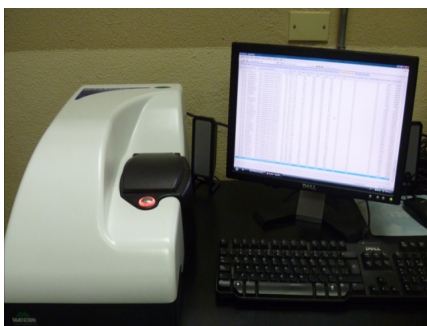


Figura 17. Equipo de DLS.

III.3.4 Estudio del tamaño respecto al pH

Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de saber si los microgeles sintetizados tienen capacidad anfotérica. Se utilizó de igual manera la técnica anterior por DLS y se determinó el tamaño de partícula a diferentes valores de pH. Se prepararon soluciones buffer de pH 3 a 10 con fuerza iónica (FI) de 0.1 M de acuerdo a las cantidades mostradas en el **Anexo VII.1**. Se tomó una alícuota de la reacción a la cual se le deseaba conocer el tamaño y fue diluida a una concentración final de 1:10 v/v con la solución amortiguadora correspondiente previamente filtrada por poro de 0.45 μm . Se colocó 1 ml de esta dilución en la celda y fue introducida en el equipo para su lectura. El tiempo de equilibrio de la muestra fue de 10 minutos con temperatura de 25°C.

III.3.5 Estudio del tamaño respecto a la temperatura

Para conocer como la LCST de la molécula de NIPAAm es afectada una vez que polimeriza en presencia de los demás compuestos en la cadena principal, es necesario monitorear cómo cambia el D_h respecto a la temperatura en un sistema acuoso primeramente. En este análisis se utilizó también la técnica de DLS que se mencionó anteriormente en el mismo equipo. Se tomó una alícuota de la reacción a la cual se le desea conocer el tamaño y fue diluida a una concentración final de 1:10 v/v con agua destilada y filtrada por membrana con poro de 0.2 μm . Se colocó 1 ml de esta dilución en una celda y fue introducida al equipo para su lectura y determinar el punto de cambio, se graficaron los datos y obteniendo la derivada de la gráfica se pudo obtener el punto de inflexión.

III.3.6 Estudio del efecto del pH en la LCST de los microgeles

Este estudio se realizó con el fin de conocer cómo se ve afectado la LCST de las micropartículas a distintas concentraciones de pH con fuerza iónica de 0.1M. Los cálculos y las cantidades utilizadas para la preparación de las soluciones amortiguadoras se muestran en el **Anexo VII.1**.

Se tomó una alícuota de la reacción problema y fue diluida 1:10 con la solución buffer correspondiente previamente filtrada por poro de 0.45 μm . Para este estudio se utilizó la misma técnica de dispersión de luz dinámica en el mismo equipo. Se coloca 1 mL de esta dilución en una celda y es introducida al equipo para su lectura. Para determinar el

punto de cambio, se graficaron los datos y obteniendo la derivada de la gráfica se pudo obtener el punto de inflexión.

III.3.7 Estudio del efecto de la FI en el D_h en el punto isoeléctrico (PI)

Se realizó este análisis con el propósito de observar si los microgeles mostraron efecto anti-polelectrolito bajo distintas concentraciones de sales. Para esto se prepararon soluciones buffer pH 4 ajustando la FI a 0.1, 0.3 y 0.5 M con NaCl. Los cálculos se muestran en el **Anexo VII.2**. Se midió el D_h por la técnica de DLS utilizando el equipo antes mencionado; la muestra fue preparada diluyendo la solución de reacción ya purificada en proporción 1:10 v/v con el buffer correspondiente previamente filtrado por poro de 0.45 μm . Se tomó 1 ml de esta dilución y se leyó en el equipo. Se dieron 10 minutos de equilibrio a una temperatura de 25 °C antes de que el aparato comenzara a leer.

III.3.8 Estudios de carga superficial de partícula

Para determinar el movimiento electroforético de las partículas y conocer su carga superficial se utilizó la técnica de dispersión de luz en el equipo Zetasizer Nano ZS modelo ZEN 3500 de la compañía Malvern Instruments. Se tomó una alícuota de 1 ml de la reacción correspondiente y se diluyó a una proporción 1:2 v/v. Los medios diluyentes (previamente filtrados con membrana de poro 0.45 μm) fueron agua y soluciones buffer pH 3, 4 y 10 (FI de 0.1 M). Después se colocó 1 ml de esta dilución en una celda para su lectura en el equipo antes mencionado.

III.3.9 Estudios del efecto del pH en la transmitancia

Se tomó un volumen determinado de las soluciones con microgeles purificados y se mantuvieron en agitación dentro de un sistema de circulación térmica hasta alcanzar la temperatura de 25°C, para esto se utilizó un recirculador de agua Cale Parmer Polystat 1Z101-10. Una vez alcanzada la temperatura, se llevó la solución hasta un valor de pH 3 con HCl 0.1087 N (potenciómetro utilizado: Corning Scholar 425), se tomó una alícuota y se registró como solución blanco (100% de transmitancia) en el equipo de UV-VIS Beckman Coulter DU-520 a una longitud de onda de 400 nm. La alícuota es regresada a la solución original a pH 3 para posteriormente incrementar el valor de pH de esta solución

con KOH 0.0848 N, registrando el porcentaje de transmitancia (%T) respecto al incremento en el valor de pH y regresando cada una de estas muestras a la solución después de su lectura, con el fin de no modificar el volumen original. El experimento se detuvo cuando no se observaron más cambios en %T.

III.3.10 Determinación de la morfología de las micropartículas

Se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar la morfología con el fin de demostrar si existía o no la presencia de una estructura núcleo-coraza. Para preparar la muestra se tomó una alícuota de la solución inicial de reacción ya purificada y se llevó a una concentración final de 0.4 mg/ml. Para este cálculo, fue necesario asumir que todos los componentes agregados antes de la síntesis fueron 100% polimerizados.

Se depositó 2 μ L de esta solución en una rejilla LACEY y se dejó secar. Una vez seco se tiñó la muestra con ácido fosfotúngstico (1% w/v) colocando 1 μ L sobre la rejilla con la muestra ya seca. Se dejó la rejilla con la muestra teñida secando a temperatura ambiente durante toda una noche. Las muestras fueron transportadas en tubos Eppendorf y observadas con el microscopio JEOL JEM-2010 (Resolución $\delta \approx 1.8-1.9 \text{ \AA}$, 200 kV) que se encuentra en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) del municipio de Ensenada, B.C. (**Figura 18**).

III.3.11 Rendimiento por gravimetría.

Este análisis se realizó para conocer la cantidad en peso que se recupera por reacción de síntesis que se lleva a cabo. Se tomó un volumen conocido de la reacción purificada y se congeló por completo; después el vial con la muestra solidificada se colocó en el equipo de liofilización Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco (**Figura 19**) hasta que se obtuvo un producto totalmente deshidratado; las condiciones fueron: T= -50 °C, 122×10^{-3} Mbar. Una vez seco el producto, se pesó en la balanza analítica modelo M-220 de la compañía Denver Instruments. Finalmente, se almacenaron las micropartículas deshidratadas en un lugar seco y con temperatura ambiente hasta estudios posteriores.

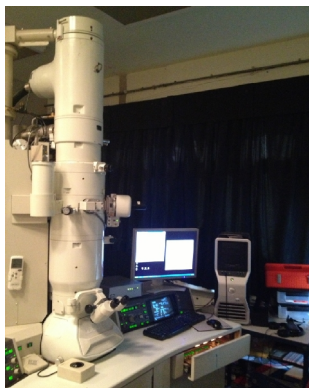


Figura 18. Microscopio electrónico de transmisión.



Figura 19. Equipo de liofilización utilizado para deshidratar las micropartículas.

III.3.12 Reconstitución de las micropartículas

El estudio se llevó a cabo con el fin de conocer si las partículas podían volver a su tamaño original, es decir, a las dimensiones que tenían al momento de terminar su purificación. En base al peso de los compuestos añadidos para la síntesis y asumiendo un 100% de conversión en polímero de los mismos, se determinó la concentración inicial y con el peso seco recuperado del proceso de liofilización, se llevó a la misma proporción diluyendo las micropartículas deshidratadas con agua destilada y filtrada por poro de 0.2 μm . Por último se re-dispersaron con la ayuda de una mosca y un agitador magnético colocados en el sistema de recirculación térmica Polystat 12101-10 de la compañía Cale Parmer a 25°C por 24 horas.

III.3.13 Estudio de la concentración de AMA, MAOB y DMAEM presentes en las micropartículas por titulación potenciométrica

Se llevó a cabo la metodología reportada por K. Ogawa y colaboradores (2003): en 50 ml de KCl 0.5 M se disolvieron 100 mg de micropartículas liofilizadas. Las soluciones titulantes fueron preparadas a una concentración final de 0.08478 N de KOH y 0.1087 N de HCl; la valoración de estas soluciones se determinó de acuerdo al procedimiento reportado en la NMX-AA-SCFI-2001, los cálculos se encuentran en el **Anexo VII.3**. Para mantener el procedimiento a temperatura constante, la calibración y las titulaciones se hicieron dentro de un sistema de recirculación térmica (**Figura 20**), en donde se mantuvieron tanto las

muestras como los titulantes a 25 °C. El potenciómetro Corning Scholar 425 fue verificado también con soluciones buffer comerciales pH 4 y 7. Las muestras estuvieron en agitación constante durante todo el experimento.

III.3.14 Estudios de espectroscopia infrarrojo de microgeles anfotéricos

Con el fin de poder identificar los grupos funcionales principales del AMA, MAOB y DMAEM, los microgeles purificados fueron caracterizados por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en el equipo Thermo Scientific modelo Nicolet iS5 lector ATR iD5 (**Figura 21**); para esto se tomó cierta cantidad de microgeles liofilizados y fueron colocados directamente en el equipo para su lectura.

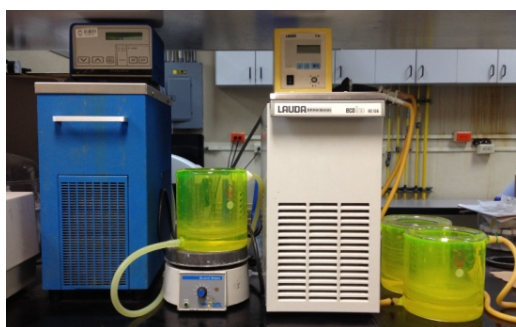


Figura 20. Sistema de recirculación térmica utilizada para titulación potenciométrica.



Figura 21. Equipo de FT-IR

CAPÍTULO IV
RESULTADOS

IV.1 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MONÓMEROS

IV.1.1 Purificación de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm)

El producto obtenido de la purificación de NIPAAm son unos cristales de color blanco (**Figura 22**).

IV.1.2 Purificación del *N,N'*-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) y del ácido metacrílico (AMA)

Los productos obtenidos después de ser pasados por la columna con perlas removedoras de hidroquinona no sufren un cambio físico perceptible.

IV.1.3 Síntesis del ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB)

La síntesis del MAOB se realizó según la ruta de síntesis reportada por Licea y colaboradores (2003). El producto fue un sólido blanco (**Figura 23**) y fue almacenado en refrigeración hasta su uso. Se recuperó un peso de 6.2246 g de sólido purificado por la reacción de síntesis y el rendimiento fue de 60.43% según los cálculos mostrados en el **Anexo VII.4**.

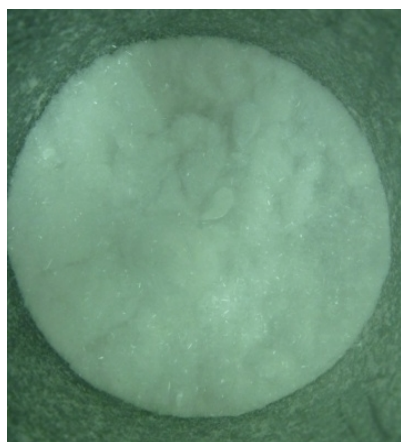


Figura 22. Apariencia de NIPAAm purificada.

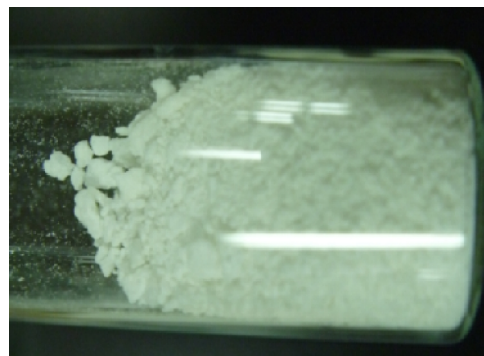


Figura 23. Aspecto físico de MAOB.

IV.1.4 Caracterización de MAOB

Los grupos funcionales principales de la molécula de MAOB se recopilan en la **Tabla 8**. El espectro infrarrojo original se muestra en el **Anexo VII.8**.

Tabla 8. Señales de IR de los principales grupos funcionales de MAOB.

Estiramiento ó flexión	Tipo de señal	Número de onda (cm ⁻¹)
O-H	Alcohol	Banda ancha desde 3600 a 2400
C-H	Aromático y alifático	3077.51 y 2926.85
C=O	Éster	1738.9
C=O	Ácido carboxílico	1693.63
C=C	Aromático y alifático	1608.54-1485.82
CH ₃	Metilo	1459.29
C-O	Éster, ácido carboxílico y alcohol	1299.68-1032.49
C-H	Alqueno	946.56
C-H	Aromático	850.29-654.09

IV.2 SÍNTESIS DE MICROGELES ANFOTÉRICOS

IV.2.1 Síntesis de microgeles termosensibles con MAOB/DMAEM

En la reacción del vial 1 (**Figura 24**) se observaron heterogeneidades y la presencia de precipitado. Sin embargo, el aspecto físico de reacciones restantes fueron homogéneas y sin presencia de aglomeraciones antes y después de la purificación.

Todas las soluciones presentaron distintas coloraciones variando entre tonos blancos opacos, blanquiazul semitransparente y azul transparente (**Figura 24**); se especifican sus características en la **Tabla 9**.

Se puede observar en el lado izquierdo de la fotografía (**Figura 24**) tres de las soluciones no anfotéricas (controles). Si comparamos los tres viales (C1, C2 y C3) se puede apreciar que existe una tonalidad blanca semitransparente cuando NIPAAm esta polimerizada sin la presencia de algún monómero iónico (C1).

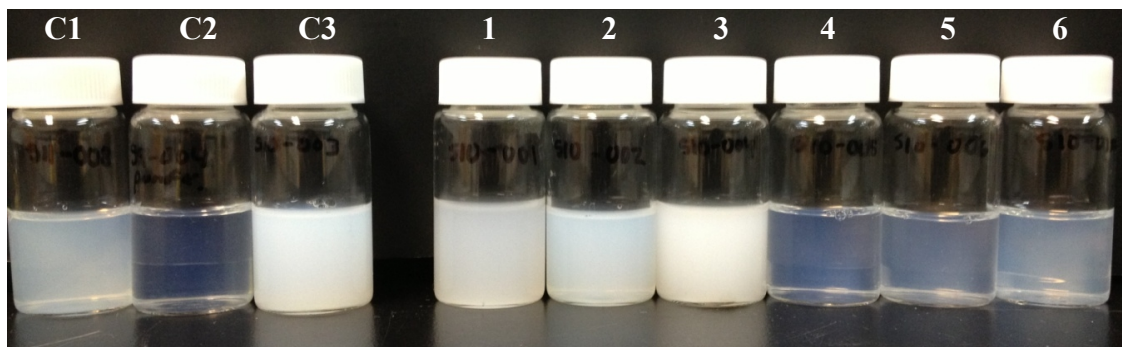


Figura 24. Aspecto físico de las reacciones control y MAOB/DMAEM a 25 °C.

Tabla 9. Especificaciones de la serie MAOB/DMAEM sintetizada (**Figura 24**).

Etiqueta	Tipo de microgel	% molar de MAOB/DMAEM respecto a moles de NIPAAm.
C1	Control	0/0
C2	Control	0/6.6
C3	Control	8.1/0
1	Anfotérico	25.4/6.6
2	Anfotérico	8.1/6.6
3	Anfotérico	16.2/6.6
4	Anfotérico	8.1/13.2
5	Anfotérico	8.1/8.1
6	Anfotérico	6.6/6.6

El vial C2 es la mezcla de NIPAAm con DMAEM, y muestra un claro color azul transparente, la tonalidad blanca desaparece y en C3 se vuelve a observar el color blanco cuando NIPAAm y MAOB están en la misma mezcla; sin embargo, este último vial muestra un tono blanco más intenso y de mayor opalescencia. También podemos observar que en las soluciones donde fueron añadidos tanto MAOB como DMAEM en una misma síntesis, los tonos blancos opacos son proporcionales a la concentración de MAOB añadida en la mezcla (vial 3), favoreciendo las tonalidades azuladas si disminuimos este y aumentamos la cantidad de DMAEM agregado (vial 4).

En la imagen, lo anterior no coincide si comparamos el vial 2 (8.1 % molar respecto a NIPAAm) y el vial 1 (25.4%) ya que este último se ve más blanco que el anterior. Esto se

debe únicamente al efecto de decantación al vaciar la muestra al vial, ya que este compuesto mostró precipitados desde el término de su síntesis.

Cuando las proporciones están 1:1 en el caso de los viales 5 y 6 se puede apreciar también la existencia de tonalidades blanquiazules semitransparente, y si comparamos ambas se puede apreciar un tono más blanco cuando tenemos un porcentaje molar mayor de ambos componentes en solución. Lo precedente se podría quizás asumir como una mayor presencia de MAOB en la mezcla si tomamos en cuenta la apariencia física de este antes de polimerizar. Después de la purificación no hay cambios en su coloración.

IV.2.2 Síntesis de microgeles anfotéricos con AMA y DMAEM

La apariencia física de reacciones, antes y después de purificar, fue homogénea y sin presencia de aglomeraciones. Presentaron también distintas coloraciones variando entre tonos blanquiazul semitransparente y azul transparente; en esta serie no hubo la presencia tonos blancos opalescentes ya que no hubo presencia de MAOB en ella (**Figura 25**); se especifica cada una de las síntesis en la **Tabla 10**.

Se puede observar en el lado izquierdo de la fotografía (**Figura 25**) tres de las soluciones control. C1 y C2 son los mismos viales que se utilizaron en el apartado anterior. Si comparamos estos dos viales con C4, vemos en este último que el color blanco reaparece pero en un tono azulado semitransparente. En esta serie al parecer conforme aumenta la cantidad añadida de AMA aumenta la tonalidad blanquiazul de la disolución, con una tendencia mayor hacia tonalidades blancas, mientras que si aumentamos la cantidad de DMAEM, más transparencia existe en la mezcla (viales 7,8 y 11). En el vial 9 la tonalidad azul es casi imperceptible, esto coincide con la serie MAOB/DMAEM en que a mayor presencia de ácido en la mezcla mayor tonalidad lechosa.

Cuando las proporciones están 1:1 en el caso de los viales 10 y 11 se puede apreciar también la existencia de tonalidades blanquiazules semitransparente, y si comparamos ambas se puede observar un tono más lechoso cuando tenemos un porcentaje molar mayor de ambos componentes en solución. Lo anterior coincide de igual forma con lo observado en los viales con MAOB, quizás este efecto es también una contribución del carácter ácido de ambos compuestos.

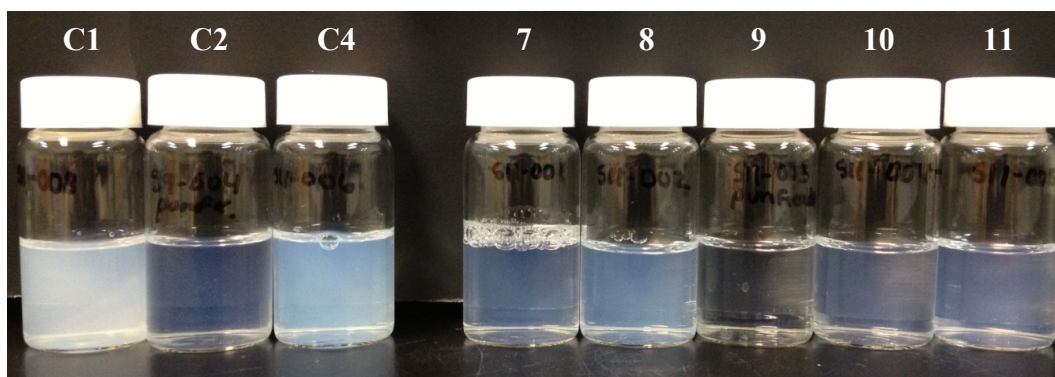


Figura 25. Aspecto físico de las reacciones control y AMA/DMAEM a 25 °C.

Tabla 10. Especificaciones de la serie AMA/DMAEM sintetizada (**Figura 25**).

Etiqueta	Tipo de microgel	% molar de AMA/DMAEM respecto a moles de NIPAAm.
C1	Control	0/0
C2	Control	0/6.6
C4	Control	8.1/0
7	Anfotérico	8.1/6.6
8	Anfotérico	16.2/6.6
9	Anfotérico	8.1/13.2
10	Anfotérico	8.1/8.1
11	Anfotérico	6.6/6.6

IV.3 CARACTERIZACIÓN DE MICROGELES

IV.3.1 Estudio del D_h de microgeles control y anfotéricos con MAOB/DMAEM y AMA/DMAEM

El hecho de no observar ningún tipo de precipitado al término de la síntesis de ambas series de microgeles anfotéricos es un buen indicio de una posible formación de partícula; sin embargo, la reacción MAOB 25.4: DMAEM 6.6 fue descartada de estudios posteriores, debido que al analizar el tamaño de partícula de esta reacción se observaron distribuciones multimodales y aglomeraciones.

El tamaño del D_h en términos de intensidad (D_{hI}) y volumen (D_{hV}) tanto para las síntesis MAOB/DMAEM y AMA/DMAEM se muestran en la **Tabla 11**. El diámetro promedio Z ($D_{hZ_{Prom}}$) es un valor de D_h calculado por el equipo DLS utilizado en estos estudios y puede ser considerado como el resultado más cercano al tamaño real; debido a que los microgeles mostraron una sola distribución tanto en la gráfica de D_{hI} y D_{hV} , condición que fue necesaria para poder tomar $D_{hZ_{Prom}}$ como el parámetro más confiable de los dos mencionados anteriormente (Zetasizer nano series user manual, 2008).

Los datos en la **Tabla 11** son los resultados de las mediciones que se hicieron antes y al término de la purificación, a su vez se muestran las gráficas de distribución (**Figuras 26, 27 y 28**). Para fines prácticos y comparativos, se muestran también el diámetro de los microgeles controles sintetizados.

En las gráficas únicamente se muestran aquellas distribuciones de tamaños después del proceso de purificación, ya que son las partículas que se mantuvieron estables las que nos interesan para los estudios posteriores. Si se analizan los tamaños entre los microgeles no anfotéricos, se puede observar que el D_{hI} varía considerablemente entre ellos; el tamaño de partícula aumenta cuando MAOB es copolimerizados con los demás monómeros y disminuye cuando solo hay presencia del DMAEM y/o NIPAAm.

La polidispersidad los geles control se mantienen muy similares. Sin embargo la polimerización con AMA/NIPAAm tiene el D_h mucho más reducido respecto al microgel que no tiene ningún monómero iónico en su red, y también su polidispersidad mejora si comparamos esta reacción con respecto a la que tiene un % molar de MAOB 8.1: DMAEM 0 respecto a los moles de NIPAAm. Los tamaños de los microgeles anfotéricos MAOB/DMAEM tienen una relación similar a lo explicado en el enunciado anterior (a mayor presencia del ácido, mayor tamaño) tomando como punto de referencia la reacción MAOB 8.1: DMAEM 6.6. Al aumentar únicamente el porcentaje molar (% mol) de ácido al doble de esta concentración se puede observar un aumento considerable en el tamaño, mientras que si se incrementa sólo el porcentaje molar de DMAEM dos veces el D_h disminuye.

Ahora bien, si analizamos la serie de geles anfotéricos que contienen AMA/DMAEM, no hay grandes cambios cuando se incrementa el porcentaje molar del ácido al doble; pero cuando el %mol de DMAEM lo duplicamos respecto a la misma

síntesis, no hay formación de micropartículas. Se pudo observar que a mayor concentración de MAOB: DMAEM mayor es el D_h . Sin embargo, los microgeles con AMA/DMAEM en las mismas concentraciones, no muestran variaciones considerables en su tamaño de diámetro entre estas dos síntesis.

Tabla 11. *Tamaños de los microgeles anfotéricos antes y después de su purificación (25 °C).*

% mol ácido: base respecto a los moles de NIPAAm añadidos	Antes de purificación				Después de purificación			
	$D_h I$ (nm)	$D_h V$ (nm)	$D_h Z_{Prom}$ (nm)	I_{PD}	$D_h I$ (nm)	$D_h V$ (nm)	$D_h Z_{Prom}$ (nm)	I_{PD}
Ácido 0: DMAEM 0	361.8	459.8	270.2	0.259	369.2	469	268.4	0.272
Ácido 0: DMAEM 6.6	171.6	177.9	132.2	0.237	190	205.9	141.8	0.259
MAOB 8.1: DMAEM 0	500.8	654	373.2	0.254	652.7	796.4	504.5	0.244
AMA 8.1: DMAEM 0	246.7	276.6	208.8	0.170	492.8	595	365.5	0.284
MAOB 8.1: DMAEM 6.6	399.7	464.5	344.0	0.149	471.6	579.1	377.2	0.216
MAOB 16.2: DMAEM 6.6	554	768	414.3	0.245	MA	MA	N/A	N/A
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	216.8	241.6	179.8	0.187	161.0	163.8	139.3	0.143
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	330.2	399.4	252	0.256	257.8	301	200.2	0.240
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	282.1	337	214	0.256	286.7	358.8	214.7	0.260
AMA 8.1: DMAEM 6.6	191.9	209.1	147.8	0.238	196.8	216.2	150.2	0.240
AMA 16.2: DMAEM 6.6	204.8	226.4	164.6	0.208	209.1	233.8	167.0	0.221
AMA 8.1: DMAEM 13.2	MNF	MNF	N/A	N/A	--	--	--	--
AMA 8.1: DMAEM 8.1	198.9	219.2	148.3	0.257	MD	MD	N/A	N/A
AMA 6.6: DMAEM 6.6	205.9	231	155.1	0.253	159.1	160.8	137.7	0.139

MA= micropartículas agregadas

N/A= no es aplica la información que arroja el equipo para la columna correspondiente en la tabla.

MNF= micropartículas no formadas.

MD= micropartículas desintegradas

Otros aspecto importante podría ser que casi todos los microgeles anfotéricos ya sea que hayan sido sintetizados con MAOB o AMA para su síntesis, caen dentro de los tamaños dados por los microgeles control, las únicas excepciones fueron los microgeles con proporción MAOB 16.2: DMAEM 6.6 y AMA 8.1: DMAEM 13.2, donde no hubo formación de partícula

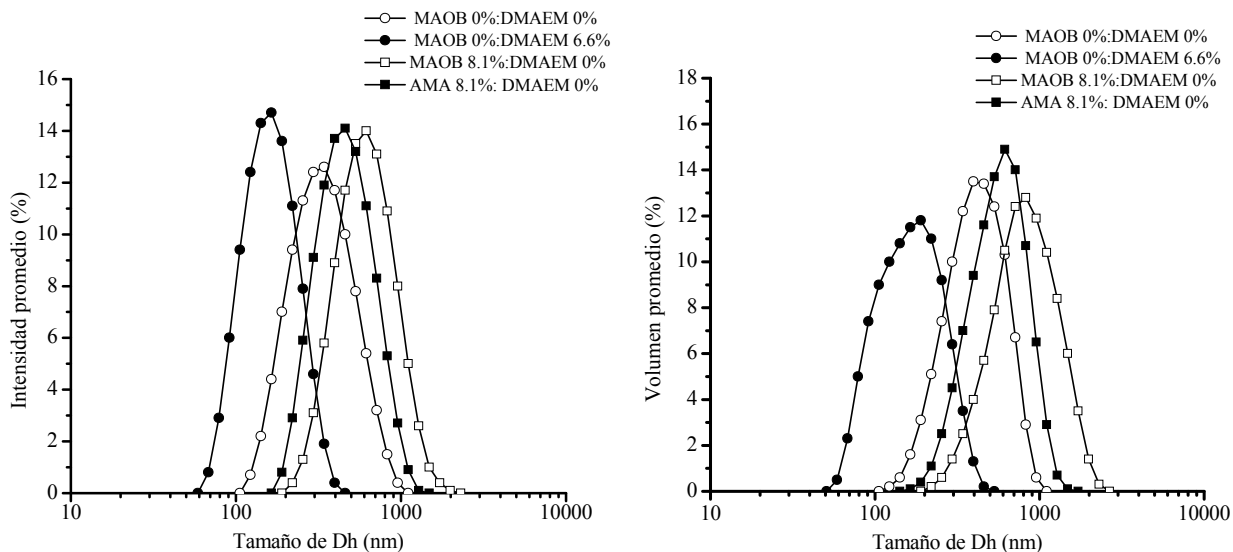


Figura 26. Distribuciones de D_{hI} y D_{hV} de los microgeles control a 25 °C.

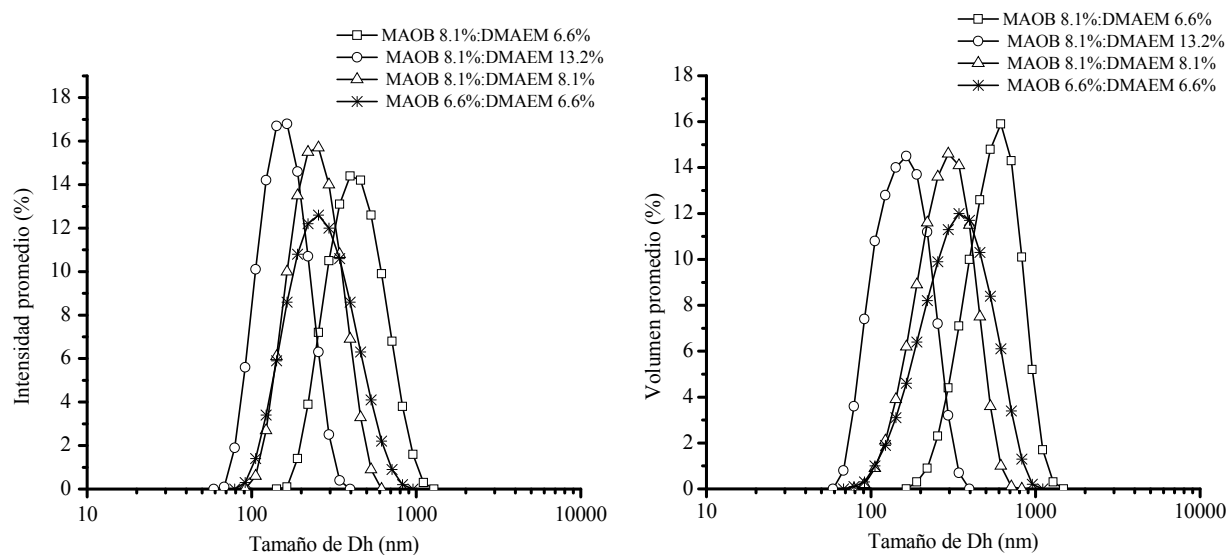


Figura 27. Distribuciones de D_{hI} y D_{hV} de los microgeles anfotéricos MAOB/DMAEM a 25 °C.

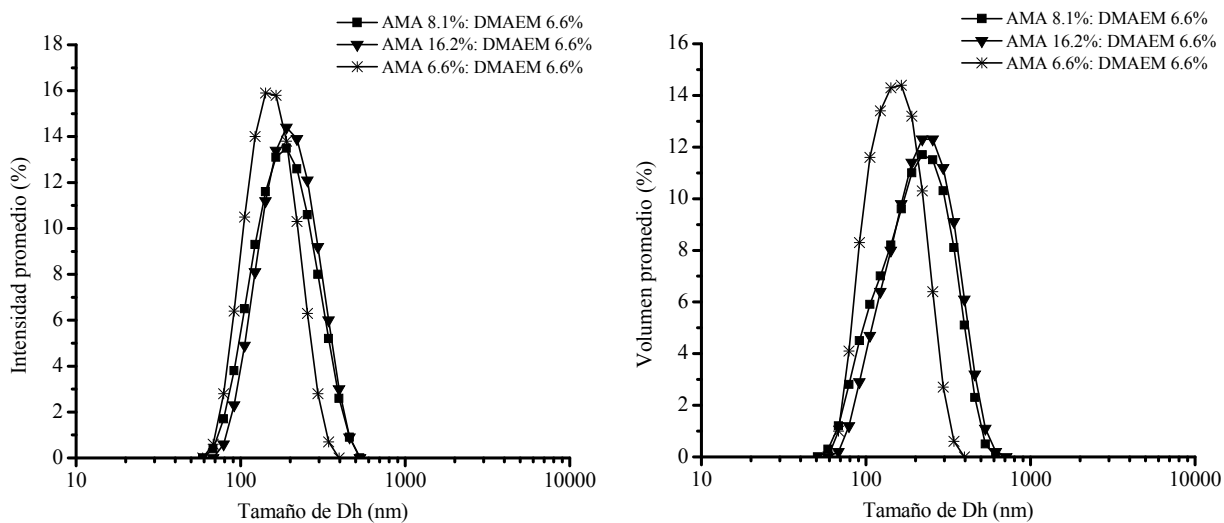


Figura 28. Distribuciones de D_hI y D_hV de los microgeles anfotéricos AMA/DMAEM a 25°C.

IV.3.2 Estudio del cambio del diámetro hidrodinámico de partícula (D_h) respecto al pH

El comportamiento de los microgeles de la serie tanto de MAOB/DMAEM y AMA/DMAEM mostraron un comportamiento anfotérico, con un PI en común a pH 4. Por debajo de este valor los microgeles tuvieron un comportamiento característico de poliacación mientras que por encima de pH 4 la conducta fue típica de un poli-anión. En ninguno de los microgeles control fue observada esta tendencia. En el microgel que solo tiene DMAEM como monómero iónico, no mostró un carácter poli-catiónico como se esperaba, mientras que el que fue sintetizado sin componentes básicos ó ácidos en su red, no muestra un cambio a diferentes valores de pH.

Analizando la serie MAOB/DMAEM y comparando esta con los tamaños de los microgeles control (**Figura 29**), se puede apreciar que los tamaños de los anfotéricos caen perfectamente dentro del rango de los tamaños que tienen cada uno de sus controles. Se observó también que el microgel que tiene únicamente MAOB como monómero iónico no soportó estudios más allá de valores de pH=5 y hubo desintegración de partícula; sin embargo, cuando es polimerizado en conjunto con la base no existe tal inconveniente.

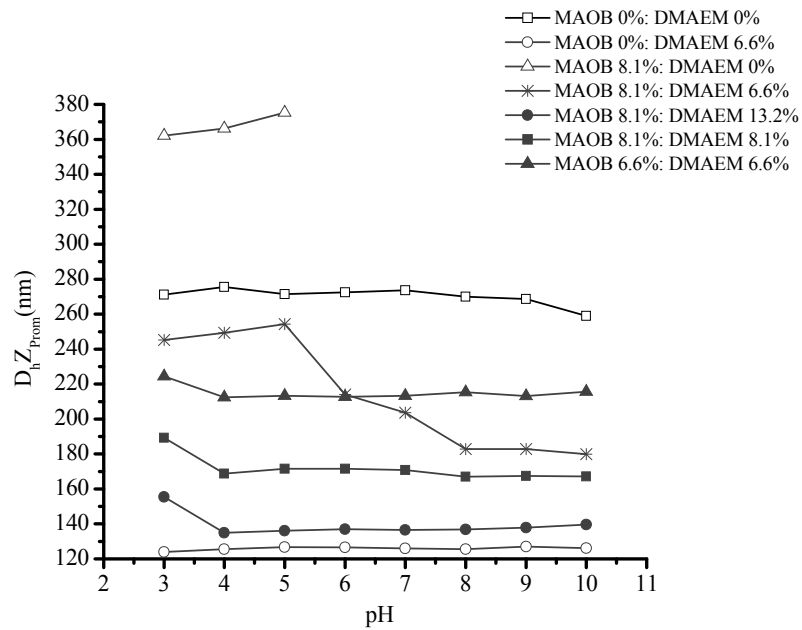


Figura 29. Cambios en el $D_h Z_{Prom}$ respecto al pH con FI 0.1 M a 25°C de la serie MAOB/DMAEM.

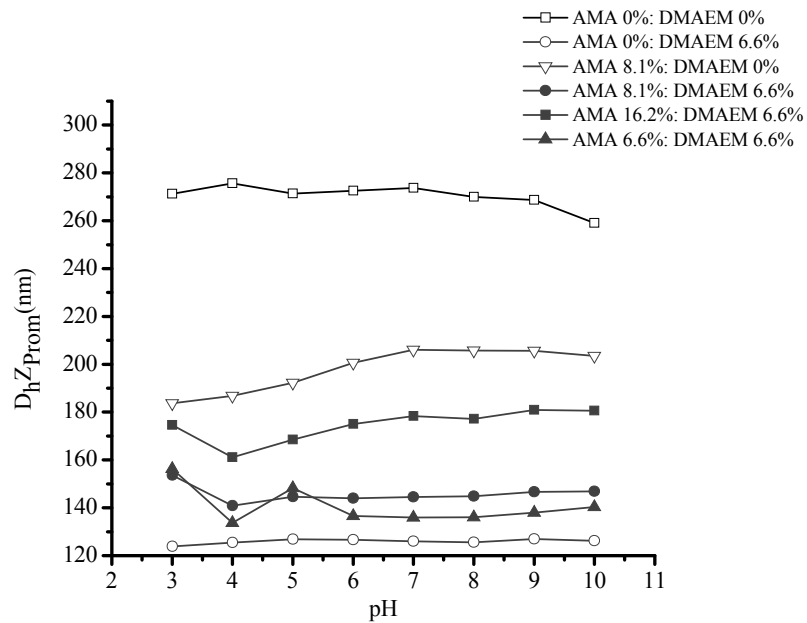


Figura 30. Cambios en el $D_h Z_{Prom}$ respecto al pH con FI 0.1 M a 25°C de la serie AMA/DMAEM.

Analizando la misma gráfica (**Figura 29**), se puede apreciar que la combinación MAOB 8.1: DMAEM 13.2 es la muestra que tiene una transición en un rango de tamaño menor entretanto los demás se mantienen muy similares entre sí. Observando cada uno de estos experimentos de manera individual (**Figura 31**), se puede apreciar en 3 de ellas un claro PI y los cambios en el $D_h Z_{prom}$ por debajo y encima de este. La síntesis MAOB 8.1: DMAEM 6.6 tuvo un comportamiento no esperado de desintegración (aumentó el IPD mientras el tamaño se reducía), sin embargo esta ocurre a valores de pH cercanos a los fisiológicos, situación que podría ser de interés como aplicación farmacéutica. La combinación MAOB 8.1: DMAEM 13.2 es la que muestra una mejor transición anfotérica.

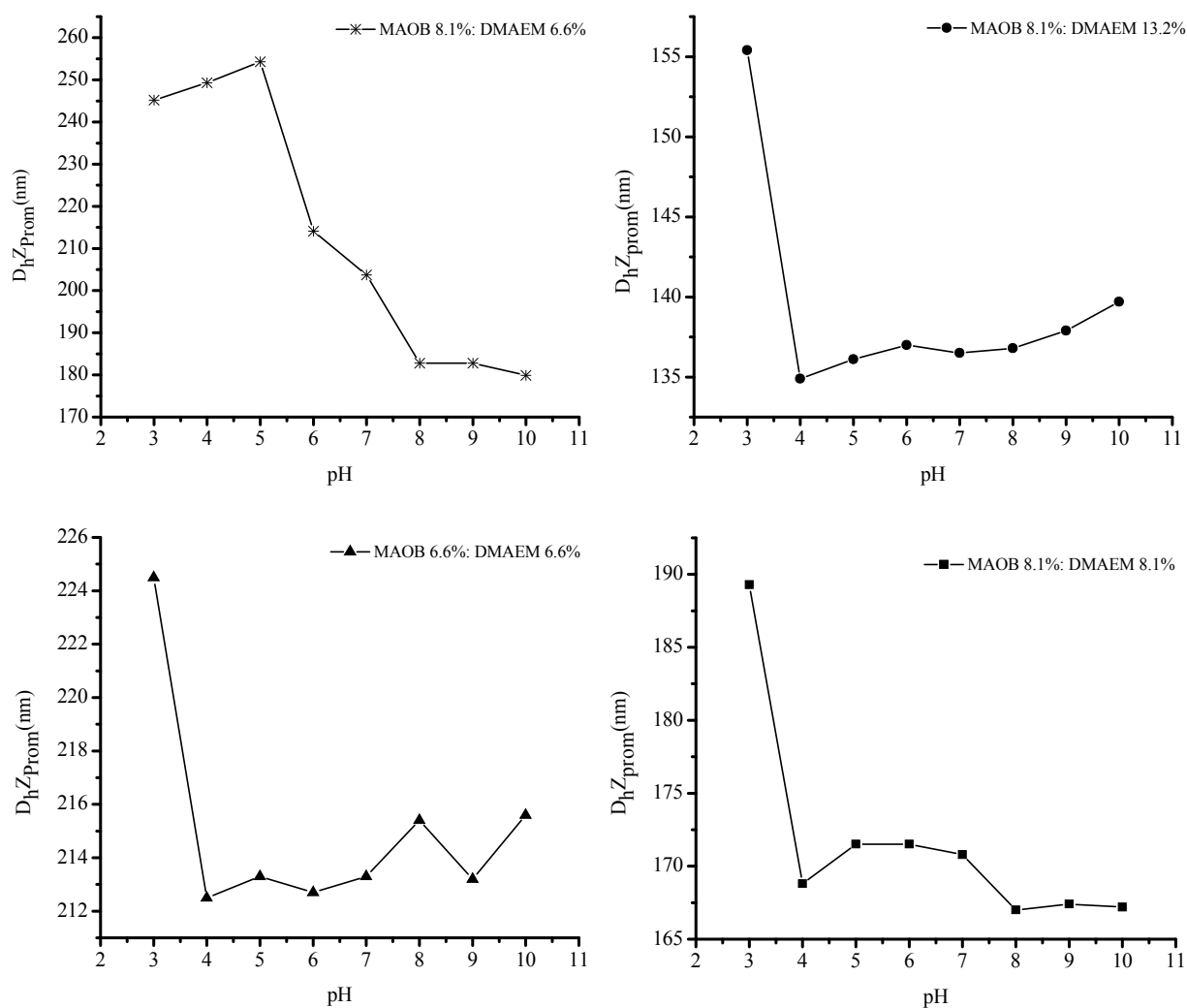


Figura 31. $D_h Z_{prom}$ respecto al pH con FI 0.1 M a 25°C de microgeles MAOB/DMAEM.

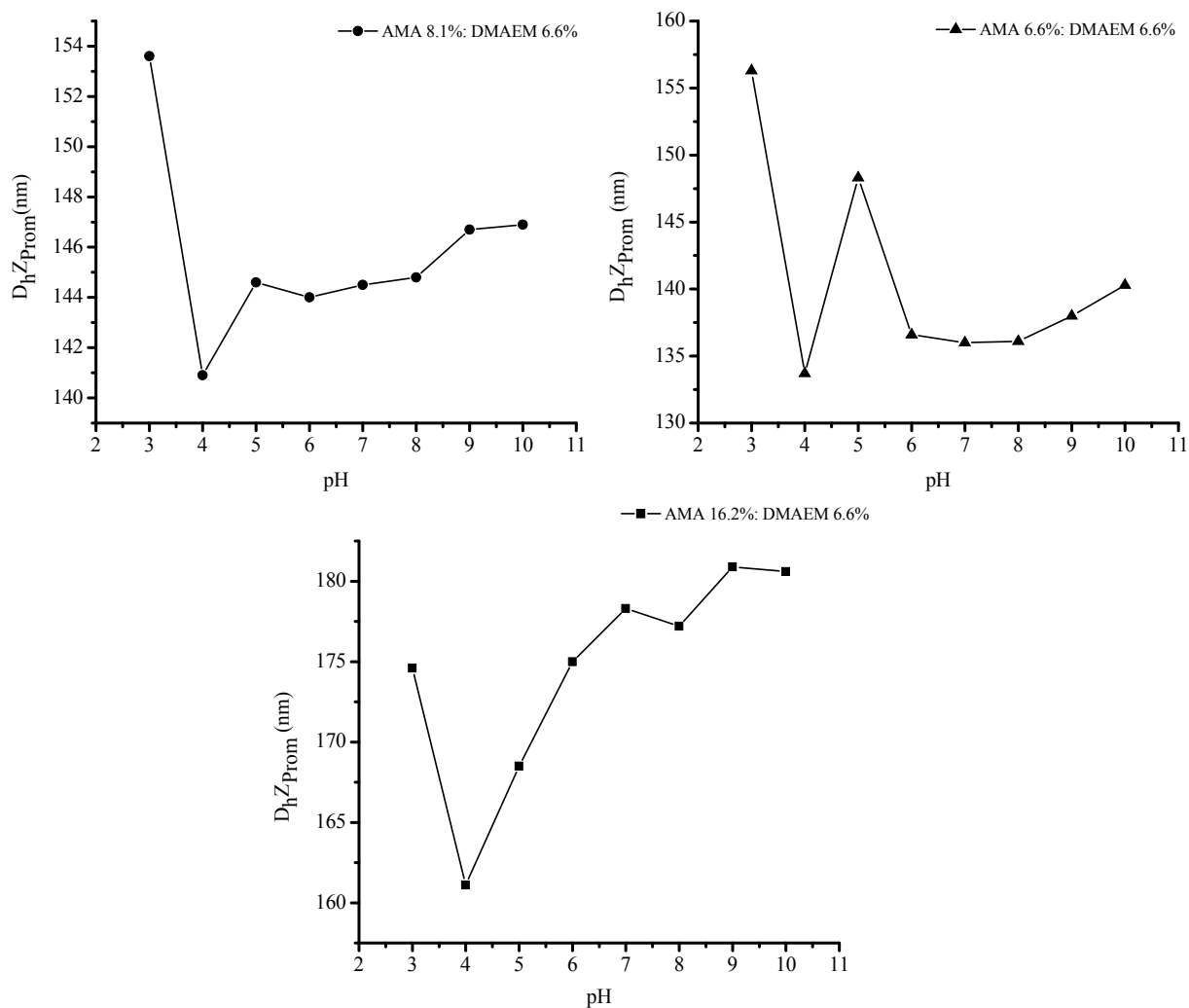


Figura 32. Cambios del $D_h Z_{Prom}$ y $D_h I$ respecto al pH con FI 0.1 M a 25°C de los microgeles AMA/DMAEM.

Ahora examinando la serie AMA/DMAEM y comparando esta con los tamaños de los microgeles control (**Figura 30**), se puede apreciar que los tamaños de los anfotéricos también caen también dentro del rango de los tamaños que tienen cada uno de los microgeles blanco y además los tamaños entre sí están más cercanos uno respecto al otro.

El microgel que tiene únicamente AMA como monómero iónico soportó estudios más allá de valores de pH=5 a diferencia del control con MAOB, y mostró un comportamiento muy característico de poli-anión incrementando su volumen a valores de pH por encima de su pKa.

Analizando la misma gráfica, se pudo apreciar que la combinación AMA 16.2: DMAEM 6.6 es la muestra que tuvo una transición en un rango de tamaño mayor entretanto los otro dos anfotéricos se mantuvieron muy parecidos entre sí.

Analizando cada uno de estos experimentos por separado, se puede observar claramente un PI (**Figura 32**). El valor del PI coincide con la serie de síntesis con MAOB y los cambios en el D_hI por debajo y encima de este coinciden con un comportamiento anfotérico. La mezcla AMA 6.6: DMAEM 6.6 es la que muestra una mejor transición tomando en cuenta la escala de la gráfica. Cuando el AMA se encuentra en concentración del 16.2 y el DMAEM 6.6 en un mismo microgel, se ve una fuerte preferencia al hinchamiento por encima de $pH=4$.

IV.3.3 Estudio del tamaño respecto a cambios de temperatura

Este experimento se realizó únicamente en los microgeles que presentaron transición anfotérica (**Figura 33 y 34**) y que podrían ser de interés para futuros análisis; los demás fueron descartados. Los resultados de este análisis se aprecian en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Valor de la LCST y del D_h correspondiente a esta temperatura de los microgeles en medio acuoso.

% molar de ácido/base	LCST	D_hZ_{Prom}	D_hI	IPD
Ácido 0: DMAEM 0	36	226.8	300	0.248
Ácido 0 : DMAEM 6.6	36	113.1	133.1	0.158
MAOB 8.1: DMAEM 0	38	326.9	455.3	0.268
AMA 8.1: DMAEM 0	36	199.4	223.9	0.119
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	40	166.6	193.4	0.148
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	40	255.8	326.1	0.237
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	44	205.3	255.3	0.204
AMA 8.1: DMAEM 6.6	42	135.5	161.1	0.165
AMA 16.2: DMAEM 6.6	36	148.3	173.9	0.159
AMA 6.6: DMAEM 6.6	36	138.4	166.8	0.182

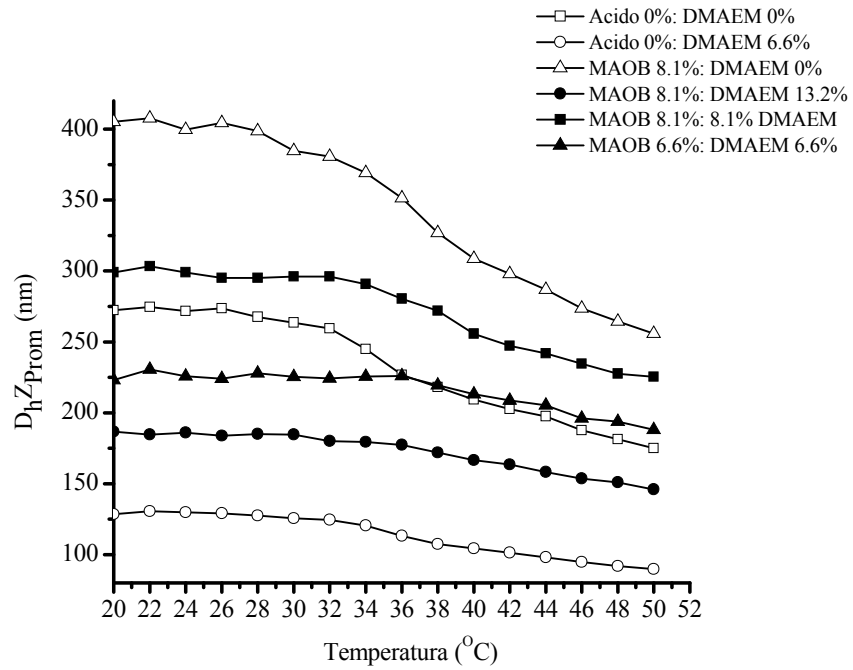


Figura 33. Gráfica de cambio del $D_h Z_{Prom}$ respecto a la temperatura de la serie MAOB/DMAEM.

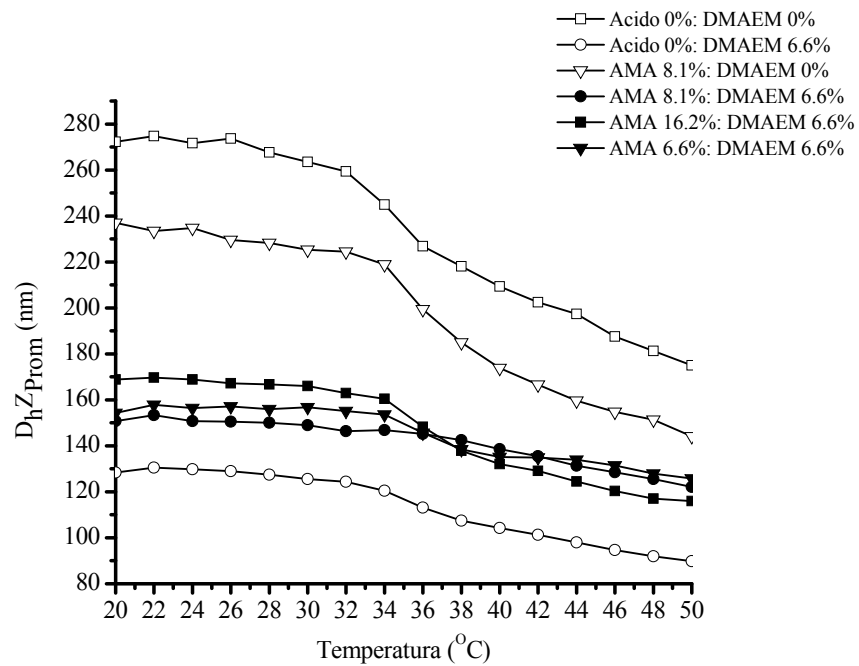


Figura 34. Cambio del $D_h Z_{Prom}$ respecto a la temperatura de la serie AMA/DMAEM.

Todos estos microgeles mostraron una LCST por encima de los 32°C, iniciando desde 36 °C hasta 44 °C, incluyendo la síntesis que no posee ningún monómero iónico; es muy probable que esto se deba a la inclusión de cadenas de PEGMEM en los microgeles. Sin embargo, aquellos microgeles que fueron sintetizados con monómeros tanto iónicos como catiónicos juntos mostraron una LCST mayor a la de sus controles. Las combinaciones MAOB/DMAEM muestran temperaturas de transición mayores que la combinación AMA/DMAEM, lo que resulta interesante si consideramos que MAOB es una sustancia anfófila (carácter hidrofílico e hidrofóbico en la misma molécula).

IV.3.4 Estudio del efecto del pH en la LCST de los microgeles

Se midió el efecto del pH en los microgeles control y anfotéricos de ambas series a valores de pH 3,4 y 10, ya que se deseaba observar las diferencias entre un valor de pH bajo, alto y aquel que coincidiera con el PI que se determinó con anterioridad. La LCST de los microgeles se muestra en la **Tabla 13**.

A valores de pH 3 y 4, todos los microgeles mostraron una LCST menor a los resultados obtenidos en los experimentos con agua. Sin embargo, a pH=10 el efecto iónico se comienza a observar en los microgeles control C2, C3 y C4 al aumentar nuevamente la temperatura de transición aun bajo la presencia de sales del buffer (0.1 M) y comparando estos resultados con C1 (ácido 0: base:0) donde la LCST disminuye aún más. No obstante, se puede observar un claro efecto del pH.

El control MAOB no soportó los experimentos a pH 10, donde mostró una desintegración debido a la presión de Donnan que se genera por la ionización. En el resto de la serie sintetizada con MAOB, solo en la síntesis MAOB 6.6: DMAEM 6.6 mostró un efecto por ionización del ácido a pH 10 elevando la transición a 40°C.

Esta observación fue aun más notoria en la serie AMA/DMAEM donde se ve un efecto todavía mayor a pH=10 en la LCST de los microgeles, aún en comparación con los resultados obtenidos en agua destilada.

Tabla 13. LCST de los microgeles a valores de pH= 3,4, 10 y con FI= 0.1 M

Etiqueta	% molar ácido: base	LSCT (°C)		
		pH 3	pH 4	pH 10
C1	Ácido 0: DMAEM 0	34	34	32
C2	Ácido 0: DMAEM 6.6	34	34	36
C3	MAOB 8.1:DMAEM 0	34	34	Desintegración
C4	AMA 8.1: DMAEM 0	34	34	36
1	MAOB 8.1: DMAEM 13.2	36	34	36
2	MAOB 8.1: DMAEM 8.1	34	36	34
3	MAOB 6.6: DMAEM 6.6	34	32	40
4	AMA 8.1: DMAEM 6.6	34	36	44
5	AMA 16.2: DMAEM 6.6	34	34	46
6	AMA 6.6: DMAEM 6.6	34	34	42

IV.3.5 Estudios de potencial zeta (ζ)

Se realizó este estudio a todos los microgeles anfotéricos incluyendo los geles control; sin embargo, solo se obtuvieron resultados concluyentes con las síntesis que se muestran en la **Tabla 14**, ya que el equipo solo arrojó datos confiables en estos dos microgeles.

Tabla 14.Valores de potencial ζ a cambios de pH.

Valores de potencial ζ (mV) en dilución 1:2 v/v de medio diluyente correspondiente				
% molar ácido: base	Agua destilada	pH 3 (FI 0.1 M)	pH 4 (FI 0.1 M)	pH 10 (FI 0.1 M)
AMA 6.6: DMAEM 6.6	6.44	8.54	1.38	-9.42
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	4.90	7.23	1.28	-5.40

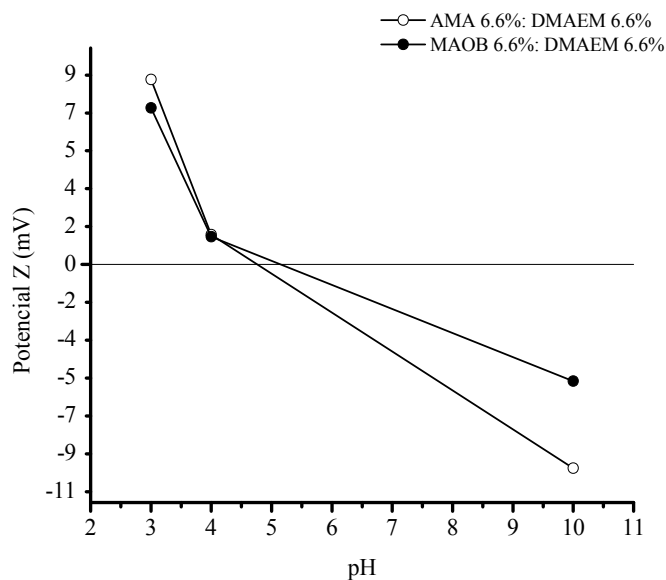


Figura 35. Cambio en el valor de Potencial ζ respecto a pH 3, 4 y 10 (FI 0.1 M)

Los resultados obtenidos corresponden a una curva típica de microgeles que poseen en su superficie cargas positivas y negativas (**Figura 35**). Se puede observar como el potencial ζ cambia de valor positivo a negativo cuando los microgeles se encuentran en medios que cambian de valores de pH 3 y 10. También se puede apreciar que a pH= 4, cuando se encuentra muy cercano a su PI, la carga de la partícula disminuye y es próxima a cero.

Los valores arrojados para cada serie son muy cercanos entre sí, pero se puede ver un ligero incremento en los valores de la síntesis con AMA y no con MAOB aún cuando las proporciones añadidas son equivalentes, siendo AMA mejor ácido para permanecer en superficie que MAOB.

IV.3.6 Efecto de la fuerza iónica (FI) en el D_h en el punto isoeléctrico

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la **Tabla 15**. Los microgeles anfotéricos de la serie MAOB/DMAEM no mostraron un comportamiento anti-polielectrolito, ya que no hubo un incremento en el D_h promedio de las partículas al aumentar la fuerza iónica en buffer pH=4. En la serie AMA/DMAEM, solo la síntesis AMA 6.6: DMAEM 6.6 mostró un ligero hinchamiento de alrededor de 10 nm al incrementar la FI de los buffer de 0.1 a 0.5 M con NaCl.

Tabla 15. Efecto de la fuerza iónica (FI) en el tamaño.

% molar ácido: base	Tamaño de $D_h Z_{Prom}$ a pH 4 (25 °C)							
	$D_h Z_{Prom}$ en agua destilada ¹		FI 0.1 M		FI 0.3 M		FI 0.5 m	
	Nm	I_{PD}	nm	I_{PD}	Nm	I_{PD}	Nm	I_{PD}
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	139.3	0.143	134.9	0.135	132.1	0.138	130.2	0.141
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	200.2	0.240	168.8	0.205	163.6	0.193	161.5	0.184
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	214.7	0.260	212.5	0.252	205	0.238	205.2	0.220
AMA 8.1: DMAEM 6.6	150.2	0.240	140.9	0.235	141.1	0.232	140.9	0.228
AMA 16.2: DMAEM 6.6	167.0	0.221	161.1	0.199	160.9	0.181	157.5	0.172
AMA 6.6: DMAEM 6.6	137.7	0.139	133.7	0.141	146.8	0.245	147.5	0.243

¹ Tamaño después de ser purificación.

IV.3.7 Estudios del efecto del pH en la solubilidad de los microgeles por transmitancia

Una vez que se pudo concluir que las micropartículas presentan carga en su superficie tanto positiva como negativa, es fácil suponer que no solo haya interacción iónica entre cargas opuestas dentro del hidrogel (intra-partícula), sino también pueden existir conexiones con otras partículas por medio de estas y formar flóculos.

De acuerdo con lo expuesto por Swarbrick y colaboradores (2003), cuando el potencial ζ es relativamente alto (25 mV o más) las fuerzas de repulsión entre dos partículas son mayores que las de atracción y en consecuencia se dispersan (de-floculan). Si se toma en cuenta lo anterior, los microgeles sintetizados no poseen valores de potencial elevados, y además presentan cargas opuestas en su superficie por lo que era probable que existieran interacciones de ambos tipos.

Los microgeles purificados sufren un cambio en el % T respecto cambios en el pH en ausencia de fuerza iónica (**Figura 36**), mientras que el valor de pH correspondiente al punto mínimo de la curva se muestra en la **Tabla 16**. Se pudo observar en la gráfica curvas de tipo U (**Figura 36**), similares a las observadas en el comportamiento que tuvieron los microgeles al observar el D_h respecto a variaciones en el pH.

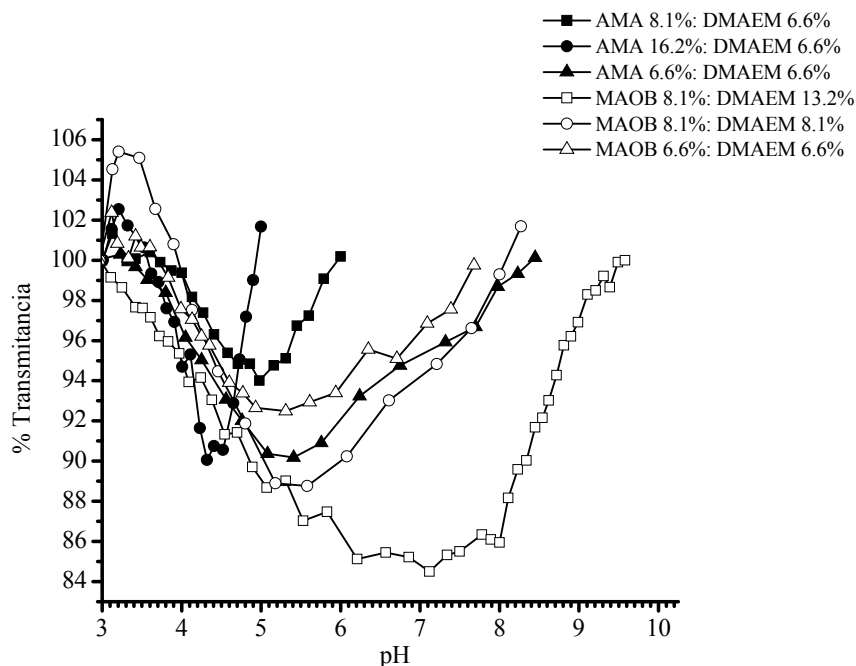


Figura 36. Comportamiento del %T respecto al pH de los microgeles anfotéricos de ambas series.

El principio del comportamiento fue el mismo pero con un enfoque inter-particular: a bajos valores de pH, la $[H^+]$ es alta, por lo que la base se encuentra ionizada y el microgel no solo sufre cambios estructurales por repulsión y reacomodo de cargas dentro del microgel sino también en la periferia, rompiendo los enlaces iónicos que pudieron haberse formado entre partículas creando flóculos. De la misma manera sucede a valores de pH elevados: la $[OH^-]$ incrementa con la consecuente ionización de los grupos ácidos, mostrando el mismo efecto anteriormente explicado.

Estas disociaciones de partículas se tradujeron en un cambio en el %T de la solución que se encuentra al 100% a valores de pH bajos y altos. La transmitancia disminuye conforme mas turbia se vuelve una mezcla, es decir, cuando las partículas dejan de estar en solución, acercándose cada más a la neutralidad (PI) y formando un precipitado en la solución. Se observó que si la $[COOH] > [NH_2]$, el % T alcanzaba su mínimo valor (neutralidad) a valores de pH bajos, lo que correspondería con una disolución de partículas debido a que el grupo amino se encuentra ionizado, mientras que cuando $[NH_2] > [COOH]$ ocurre el efecto contrario.

Tabla 16. Valor de pH en donde el %T de los microgeles anfotéricos se encuentra es su valor mínimo.

% molar ácido: base	pH
AMA 8.1: DMAEM 6.6	4.98
AMA 16.2: DMAEM 6.6	4.32
AMA 6.6: DMAEM 6.6	5.41
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	7.12
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	6.08
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	5.31

IV.3.8 Determinación de la morfología de las micropartículas

En la imagen (**Figura 37**) se observa la síntesis que tiene la combinación MAOB 6.6: DMAEM 6.6. El tamaño $D_h Z_{Prom}$ después de purificar fue de alrededor de los 214.7 nm. En las imágenes se puede apreciar formas semiesféricas y un tamaño menor, esto se puede deber a la deshidratación que sufren al preparar las muestras para su observación en el microscopio de transmisión; las dimensiones se ven alteradas a las que se esperarían en solución. Por este estudio también se descartó una conformación núcleo coraza en los microgeles.

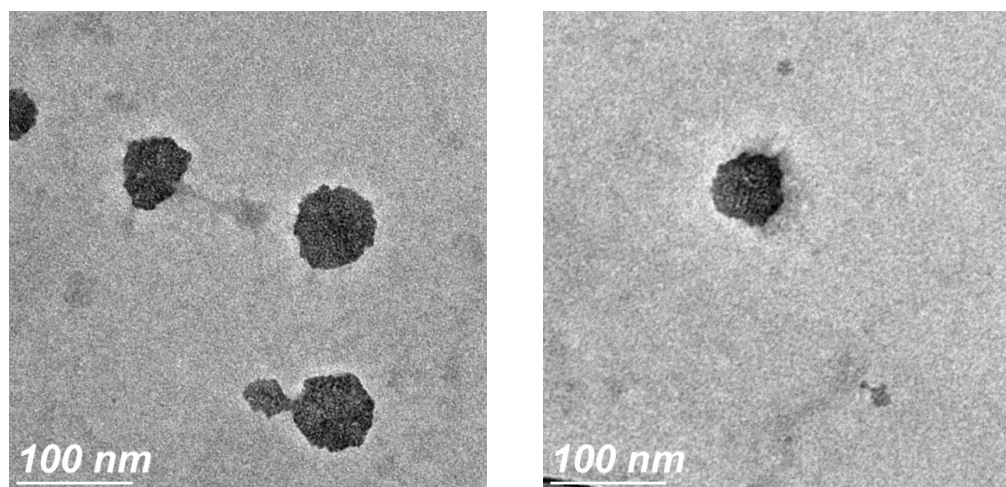


Figura 37. Micrografías TEM de los microgeles MAOB 6.6: DMAEM 6.6 teñido con ácido fosfotúngstico

IV.3.9 Rendimiento por gravimetría

El sólido obtenido de las micropartículas después del proceso de liofilización fue el que se considero para este estudio, el cual tuvo un color blanco y consistencia fibrosa. (Figura 38). Los cálculos necesarios para obtener los rendimientos se muestran en el Anexo VII.5, mientras que los resultados obtenidos están en la Tabla 17. Solo el microgel control con MAOB presentó un rendimiento por debajo del 50%; pero cuando es copolimerizado con DMAEM este rendimiento incrementa, siendo muy similares entre las dos series de microgeles anfotéricos. Aún así, todos los rendimientos están por debajo del microgel que no posee monómeros iónicos en su red.



Figura 38. Aspecto físico de las micropartículas liofilizadas.

Tabla 17. Rendimiento de los microgeles control y anfotéricos de ambas series.

% molar ácido: base	Volumen liofilizado (ml)	Peso seco recuperado (g)	Rendimiento (%)
Ácido 0: DMAEM 0	20	0.229	85.72
Ácido 0: DMAEM 6.6	17	0.1725	71.29
MAOB 8.1: DMAEM 0	10	0.0807	47.75
AMA 8.1: DMAEM 0	10	0.1179	71.09
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	10	0.1185	75.08
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	10	0.1118	71.09
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	10	0.1183	79.89
AMA 8.1: DMAEM 6.6	10	0.1168	78.03
AMA 16.2: DMAEM 6.6	10	0.1166	72.03
AMA 6.6: DMAEM 6.6	10	0.1145	77.21

IV.3.10 Reconstitución de las micropartículas

No fue posible reconstituir ninguno de los microgeles sintetizados, incluyendo a los microgeles control. Debido a la deshidratación sufrida por los micropartículas en el proceso de liofilizado, el efecto principal fueron agregaciones y desintegración de las partículas, una vez que este producto seco fue dispersado en agua destilada.

IV.3.11 Estudio de la concentración de AMA, MAOB y DMAEM presentes en las micropartículas por titulación potenciométrica

IV.3.11.1 Cuantificación de MAOB y AMA presente en las micropartículas

Los datos de las cantidades utilizadas y los resultados obtenidos en las titulaciones con KOH 0.0848 N se muestran en la **Tabla 18**, mientras que los cálculos se especifican en el **Anexo VII.6**.

Tabla 18. *Titulación básica de los microgeles control y anfotéricos de ambas series.*

Resultados en base a titulaciones con KOH 0.0848 N (25 °C)					
% molar ácido: base	Peso de la muestra (mg)	Peso titulado (mg)	% w/w incorporado (esperado)	% w/w incorporado (calculado)	% rendimiento
MAOB 8.1: DMAEM 0	40.6	2.36	7.63	5.81	76.14
AMA 8.1: DMAEM 0	40	1.62	3.86	4.05	104.92
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	40.2	1.22	8.31	3.04	36.58
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	39.9	1.66	8.07	4.16	51.54
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	40	0.87	2.93	2.18	74.40
AMA 8.1: DMAEM 6.6	39.47	0.708	3.64	1.78	49.06
AMA 16.2: DMAEM 6.6	40.1	1.9	7.07	4.73	66.90
AMA 6.6: DMAEM 6.6	40	0.62	2.95	1.55	52.54

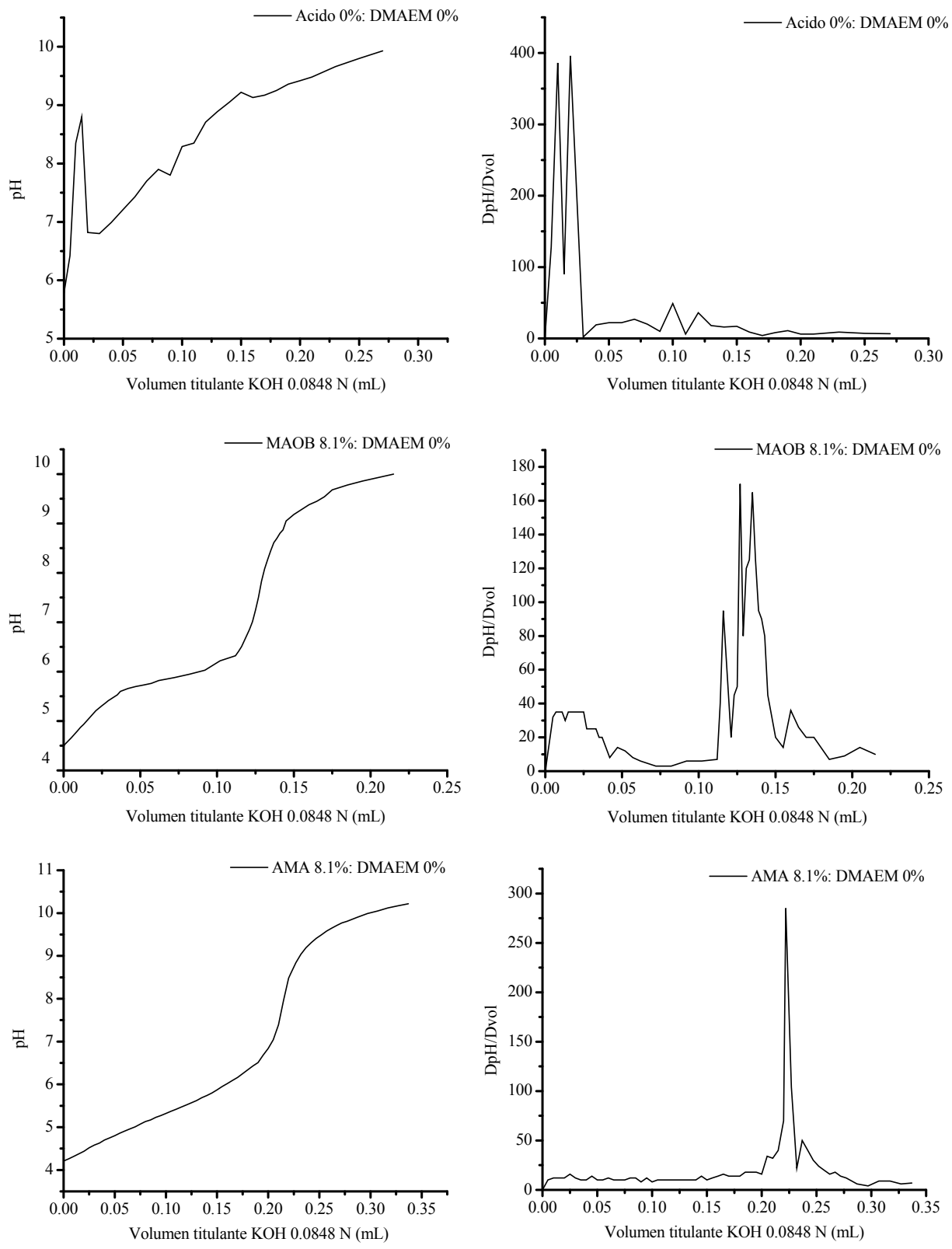


Figura 39. Titulación con KOH 0.0848 N de los microgeles control a 25°C (izquierda) y el punto de inflexión de cada uno de ellas (derecha).

El volumen de la titulación fue graficado respecto al pH y el punto de inflexión se determinó obteniendo la derivada de la gráfica. En los microgeles control de MAOB y AMA se observó la curva típica de valoración para un ácido y un claro pico máximo del volumen equivalente al momento de realizar los cálculos. En la reacción ácido 0: base 0 no se observaron comportamientos similares a los controles ácidos, por lo que se descartó algún tipo de carga presente en la red (**Figura 39**). La incorporación de ácido en los microgeles control fue más eficiente al momento de sintetizar el AMA con el resto de los componentes, obteniendo un rendimiento del 104.92% a comparación con MAOB.

En los microgeles anfoterico de la serie MAOB/DMAEM se pudo observar que a mayor cantidad de DMAEM, menor era el porcentaje de ácido presente en los microgeles, obteniendo una mayor cantidad de MAOB el microgel que tiene la concentracion molar MAOB 6.6: DMAEM 6.6.

En la serie AMA/DMAEM la cantidad de ácido presente en la red no varía mucho según la cantidad presente de base con la que fue sintetizada; sin embargo, la cantidad de AMA aumenta considerablemente cuando esta en proporción AMA 16.2: DMAEM 6.6.

A diferencia de las reacciones control, los microgeles anfotéricos presentaron picos más anchos en la gráfica donde se observa el comportamiento del volumen del titulante respecto a la derivada (d_{pH}/d_{Vol}) (**Figuras 40, 41, 42** para MAOB y **43, 44 y 45** para AMA).

Del lado derecho de cada gráfica, se puede distinguir un pico claro que corresponde al punto de equivalencia de la cantidad de moles de KOH 0.0848 N con los moles de MAOB o AMA según la serie de microgeles examinada, la cantidad en moles equivalentes se muestran en la **Tabla 18**.

IV.3.11.2 Cuantificación de DMAEM presente en las micropartículas

Los datos de las cantidades utilizadas y los resultados obtenidos en las titulaciones con HCl 0.1057 N se muestran en la **Tabla 19**, mientras que los cálculos se especifican en el **Anexo VII.7**.

Se obtuvo un rendimiento del 44.9% en la incorporación de DMAEM en la red del microgel control para esta base. Las gráficas obtenidas muestran los resultados de la titulación de la base de cada microgel anfotérico (**Figuras 40-45**). En el gráfico inferior se

Tabla 19. Titulación ácida de los microgeles control y anfotéricos de ambas series.

Resultados en base a titulaciones con HCl 0.1057 N (25°C)					
% molar ácido: base	Peso de la muestra (mg)	Peso titulado (mg)	% w/w incorporado (esperado)	% w/w incorporado (calculado)	% rendimiento
Ácido: DMAEM 6.6	18.2	0.473	5.79	2.60	44.90
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	40	1.25	10.18	3.13	30.71
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	40.4	0.56	6.31	1.38	21.96
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	40.1	0.697	5.66	1.74	30.74
AMA 8.1: DMAEM 6.6	40.3	1.4	5.60	3.48	62.15
AMA 16.2: DMAEM 6.6	39.9	1.58	5.2	3.98	76.57
AMA 6.6: DMAEM 6.6	40.1	1.37	5.6	3.41	60.90

observa el comportamiento que corresponde al volumen del titulante respecto al pH (círculos) y a su vez se muestra la gráfica correspondiente al volumen del titulante respecto a la derivada (línea). En la parte superior se detalla el mismo volumen pero respecto a la $[H^+]$ que hay en solución.

Del lado izquierdo de cada gráfica, se puede distinguir un pico claro que corresponde al punto de equivalencia de la cantidad de MAOB o AMA; sin embargo, en el lado izquierdo de cada una de la gráficas no se observa un pico para el punto de equivalencia de los moles de DMAEM.

No obstante, se analizó la gráfica superior y se observaron datos con tendencias no lineales; debido a que DMAEM es una molécula que puede captar protones, el volumen de titulante añadido no será igual a la $[H^+]$ que se encuentra en solución; esta concentración de protones “libres” se verá disminuida en un inicio debido a la captación de iones H^+ por parte del DMAEM, y aumentará conforme este vaya siendo neutralizado; de no haber una captura, se esperaría una recta lineal con tendencia a 0, es decir, el volumen de titulante sería directamente proporcional al cambio en la $[H^+]$ sin que hubiera un agente que lo desviara de esa linealidad. Se obtuvo entonces la ecuación para la pendiente de los puntos más lineales en esta semi-recta y el volumen equivalente fue el resultante cuando $y=0$, es

decir, cuando ya no hay un cambio en la $[H^+]$. En el **Anexo VII.7** se muestran las ecuaciones de las gráficas y los cálculos consecuentes.

En la **Tabla 19** las cantidades fueron reportadas en % w/w; de acuerdo con estos resultados, la serie MAOB/DMAEM tuvo cantidades de base por debajo de la síntesis control y de la serie AMA/DMAEM, demostrando que DMAEM es más afín a permanecer en la red con AMA que con MAOB. Esto concuerda con la observación que hacen Hoare y Pelton, 2008; ellos comentan que DMAEM tiene una cinética de polimerización muy similar a la cinética que tiene el ácido acrílico, por lo que deciden utilizar esta combinación para sintetizar sus geles con buenos resultados.

En la **Tabla 20** se hace una relación de los resultados obtenidos en milimoles tanto para la cantidad de DMAEM como de AMA ó MAOB según corresponda y la proporción que existe entre el ácido presente y el DMAEM. Las proporciones son muy similares entre las dos series, lo cual en su mayoría corresponde a las concentraciones añadidas en la reacción de síntesis (C_1) con las concentraciones obtenidas mediante la técnica de titulación aplicada (C_2) de cada una de los componentes.

Tabla 20. *Relación de ácido y base presente en los microgeles.*

% molar ácido: base	C_1 de ácido (mmol/g)	C_2 de ácido (mmol/g)	C_1 de DMAEM (mmol/g)	C_2 de DMAEM (mmol/g)	Proporción ácido: base
Acido 0: DMAEM 6.6	0	0	0.4381	0.1653	0:1
MAOB 8.1: DMAEM 0	0.3693	0.282	0	0	1:0
AMA 8.1: DMAEM 0	0.4500	0.4706	0	0	1:0
MAOB 8.1: DMAEM 13.2	0.3989	0.1477	0.721	0.1988	1:1.3
MAOB 8.1: DMAEM 8.1	0.3983	0.202	0.3983	0.0882	1:0.4
MAOB 6.6: DMAEM 6.6	0.3495	0.106	0.3493	0.1106	1:1
AMA 8.1: DMAEM 6.6	0.4233	0.2072	0.3483	0.2211	1:1.1
AMA 16.2: DMAEM 6.6	0.8173	0.5498	0.3362	0.2534	1:0.5
AMA 6.6: DMAEM 6.6	0.3488	0.1802	0.3488	0.2169	1:1.2

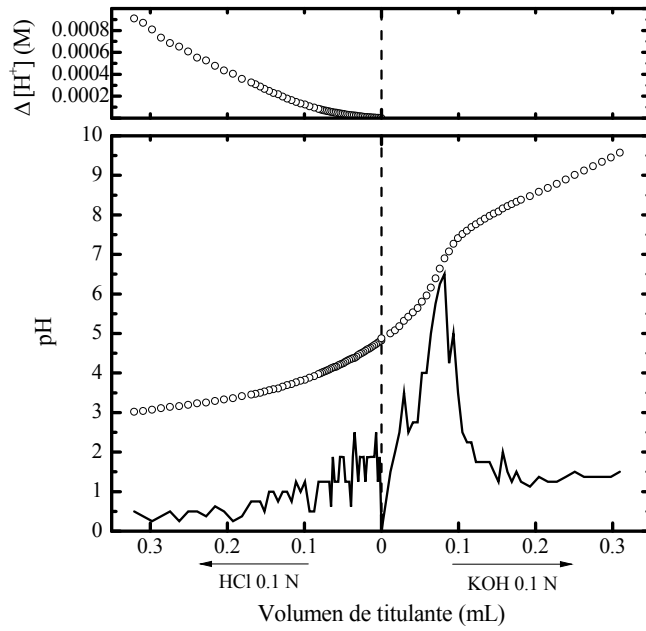


Figura 40. Titulación y punto de equivalencia de los microgeles MAOB 8.1%: DMAEM 13.2% a 25°C.

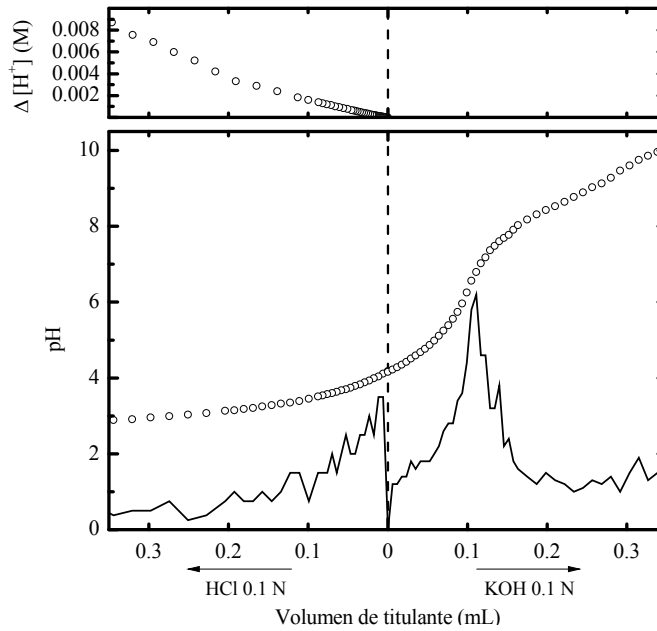


Figura 41. Titulación y punto de equivalencia de los microgeles MAOB 8.1%: DMAEM 8.1% a 25°C.

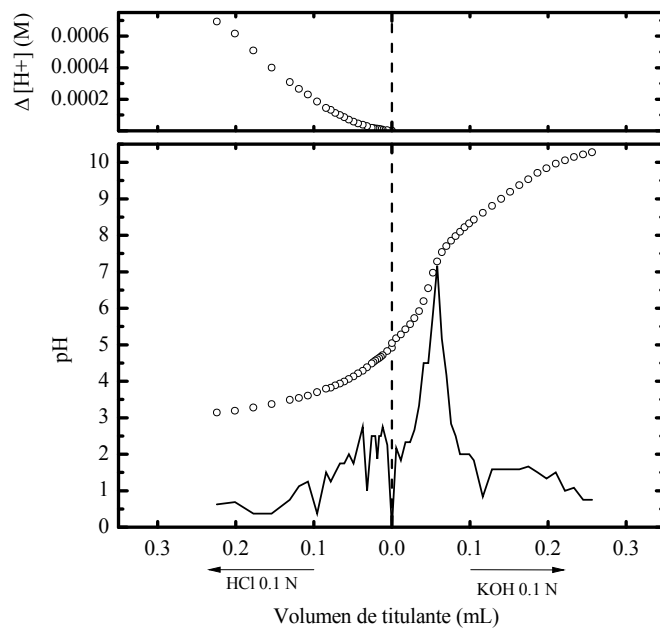


Figura 42. Titulación y punto de equivalencia de los microgeles MAOB 6.6%: DMAEM 6.6% a 25°C.

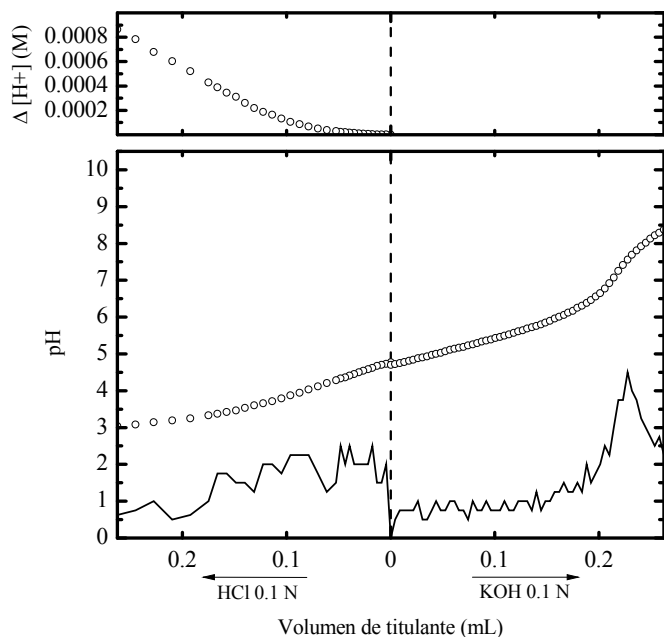


Figura 43. Titulación y punto de equivalencia de los microgeles AMA 16.2%: DMAEM 6.6% a 25°C.

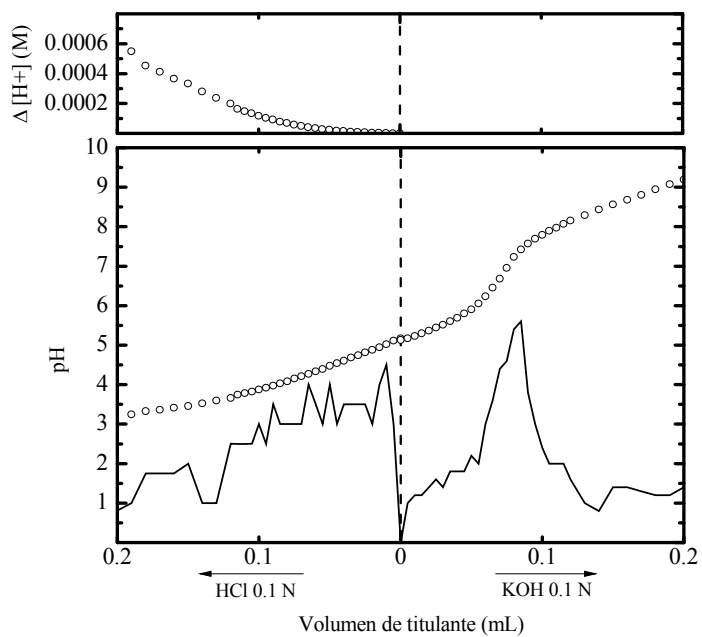


Figura 44. Titulación y punto de equivalencia de los microgeles AMA 6.6%: DMAEM 6.6% a 25°C.

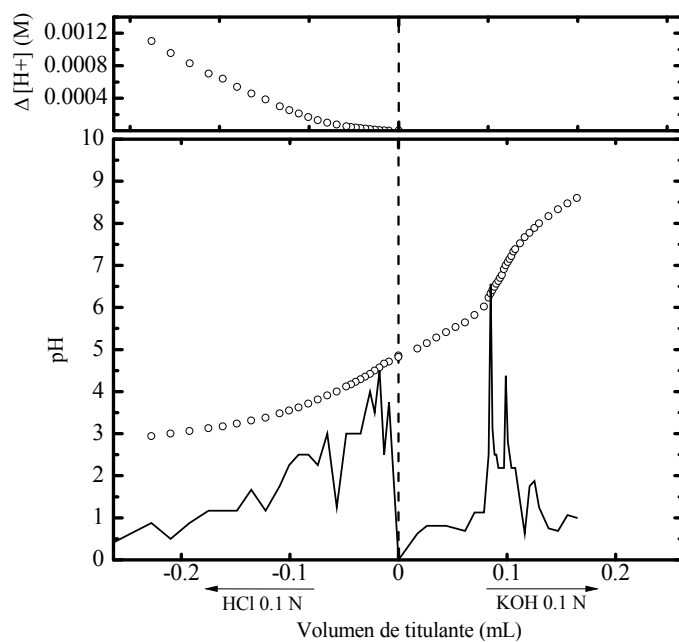


Figura 45. Titulación y punto de equivalencia de los microgeles AMA 8.1%: DMAEM 6.6% a 25°C.

IV.3.12 Estudios de espectroscopia infrarrojo

Se analizaron los espectros IR de los microgeles anfotéricos de ambas series y se pudo observar el pico que corresponde al grupo éster de los monómeros iónicos DMAEM, AMA y MAOB según corresponda entre 1720.19 y 1727.91cm^{-1} en cada una de las síntesis. Cabe mencionar que no se observa la señal C=C del grupo vinílico perteneciente a los monómeros antes de llevar a cabo la polimerización. Los espectros se muestran en el **Anexo VII.9**.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

Se logró obtener microgeles anfotéricos termosensibles a base de *N*-isopropilacrilamida mediante la técnica de polimerización por emulsión sin detergente, utilizando al polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMEM) como agente estabilizante y en un solo paso. Se realizaron dos series distintas de microgeles anfotéricos: (a) ácido metacrílico/dimetilaminoetilmetacrilato (AMA/DMAEM) como monómeros aniónico y catiónico respectivamente y (b) ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico/dimetilaminoetilmetacrilato (MAOB/DMAEM). La polimerización fue llevada a cabo con APS en ambas, bajo las mismas condiciones de reacción y utilizando *N,N'*-metilénbisacrilamida como entrecruzante.

Los microgeles pudieron ser caracterizados por técnicas de dispersión de luz dinámica, UV-VIS, dispersión de luz electroforética, microscopia de transmisión electrónica, IR y pruebas de hinchamiento-contracción en agua desionizada, en soluciones amortiguadoras pH=3-10 con FI= 0.1 y en pH 4 (PI) con FI= 0.1, 0.3 y 0.5 M.

La concentración de ácido en la reacción de síntesis tuvo un efecto en la apariencia física de las dispersiones acuosas. A mayor proporción de este, la transparencia de la solución disminuye incrementando la intensidad de un color azul transparente a un blanco opaco.

La presencia de monómero iónicos influyen de manera importante en el tamaño de las partículas, incluyendo el IPD y sus dimensiones cambian después del proceso de purificación. El $D_h Z_{Prom}$ de los microgeles inmediatamente después de la reacción síntesis fue desde ≈ 130 nm hasta ≈ 400 nm con valores de I_{PD} por debajo de 0.5. Sin embargo, los microgeles no mantuvieron estos valores una vez purificados, es decir, algunos microgeles no fueron estables a este procesos de separación. Los valores de $D_h Z_{Prom}$ después de este proceso fueron desde ≈ 140 nm hasta ≈ 500 nm. El tamaño medido, antes de ser purificadas las micropartículas, estuvo relacionado directamente con la concentración de ácido y base presente en la reacción de síntesis: si hay presencia de AMA ó MAOB, la partícula tiene un mayor tamaño que aquel microgel que no contiene ningún monómero ácido en su red, mientras que si es copolimerizado con DMAEM, el tamaño disminuye. Se llegó a la conclusión que, en el caso de AMA, al ser de carácter más hidrofílico, permite una mayor expansión de la red ya que ésta es afín con el medio que lo rodea, permitiendo un incremento en el tamaño mientras que DMAEM al ser más hidrofóbico que AMA, la red se

muestra menos extensa sucediendo el efecto contrario. Sin embargo, MAOB produce al parecer una velocidad de polimerización más lenta (Serrano et al. 2012), permitiendo que un mayor número de moléculas monoméricas fueran incluidas en el microgel en formación. Podemos también sugerir además que la forma y peso de estas moléculas es mucho mayor (206 g/mol) que AMA (86.09 g/mol), por lo que el tamaño se vería incrementado de manera considerable.

El tamaño de los microgeles depende también del pH mostrando las características de hinchamiento de un poli-cation y un poli-anion a valores de pH 3 y 10 respectivamente con un PI con valor de 4 para ambas series de microgeles.

La LCST de los microgeles estuvo por encima de los 32°C en medio acuoso (36 - 44°C), incluyendo la síntesis a la que no fue incorporada monómeros iónicos: la cantidad de PEGMEM vuelve a las partículas muy hidrofílicas. Cada microgel tiene una proporción 70:30 en peso de NIPAAm/ PEGMEM, hay que recordar que este último es liófila en agua debido a los grupos éter de la cadena repetitiva de la molécula que son capaces de formar múltiples puentes de hidrógeno y ser disueltos. Esto aumentaría de una forma importante la cantidad de agua dentro de la red polimérica y para que el proceso de contracción y expulsión del agua de la red ocurra, el grupo isopropílico de la molécula de NIPAAm deben interactuar entre sí. La formación de estos puentes de hidrógeno no favorecen la interacción entre estas partes por lo que tendrían que romperse para favorecer un proceso espontáneo ($-\Delta G$). Esto se logra incrementando la temperatura ($\uparrow\Delta H$) hasta llegar a la cantidad de energía necesaria para romper estas uniones formadas tanto alrededor de la molécula de PEGMEM, como de NIPAAm y de esta manera también desfavorecer el orden ($\uparrow\Delta S$) que existe de las moléculas de agua alrededor de ambas moléculas. Bajo estas condiciones, entonces las regiones hidrofóbicas de las moléculas de NIPAAm son capaces de interactuar entre sí con la suficiente fuerza para expulsar el agua fuera de la partícula. La variación también depende de la contribución que ofrece la presencia o no de los monómeros iónicos. MAOB favorece el incremento de LCST, mientras que AMA y DMAEM no contribuyen de manera significativa a incrementar la temperatura. Debido a que MAOB es anfifílico en agua, hay un arreglo de moléculas de agua alrededor de la zona hidrofóbica (anillo bencénico) de este ácido además de las moléculas “en jaula” que se encuentran rodeando la parte apolar de la molécula de NIPAAm contribuyendo de manera negativa al desorden en

el sistema, es decir, se necesita más temperatura que contribuya a este desorden dentro de la red, la suficiente que permita que las partes hidrofóbicas sean capaces de interactuar entre sí, expulsar el agua de la red y favorecerse.

Sin embargo, la LCST disminuye en todas las síntesis cuando los microgeles pasan de un medio acuoso a un medio donde existen sales en solución al 0.1 M y a valores de pH 3, 4 y 10. Las sales, para hidratarse, se unirán a parte del agua de la solución de polímero y la presencia de estas provoca un incremento en la entropía, esto conlleva a que el valor de ΔH disminuya para obtener un proceso favorable, es decir, un ΔG con valor negativo. Entonces, se necesita menor energía (menos temperatura) para romper enlaces por puentes de hidrogeno que hayan sido formados dentro de la red polimérica, favoreciendo de esta manera el enrollamiento de la cadena a una menor temperatura. Esta contracción por encima de la LCST se da por un proceso espontaneo. La competencia por el agua entre el polímero y las sales deshidrata las moléculas de polímero y las precipita, lo que produce gelificación. De acuerdo con Schott (2003), este fenómeno se denomina precipitación salina (salting-out). Solo la serie AMA/DMAEM mostró un aumento en la LCST a pH 10, 0.1 M por encima de los valores dados en medio acuoso, mostrando una importante contribución por parte de la ionización del AMA.

La mayoría de los microgeles no mostraron un efecto anti-poliectrolito en su punto isoeléctrico; únicamente la síntesis AMA 6.6: DMAEM 6.6 mostró un ligero incremento en el D_h al incrementar la fuerza iónica de 0.1 a 0.5 M en solución amortiguadora pH= 4. Sin embargo, a partir de los estudios de cambios en la turbidez respecto al pH y de potencial ζ , se demuestra que existen interacciones inter-partículas.

Al parecer los monómeros iónicos tanto ácidos como básicos se encuentran distribuidos tanto en la superficie como en el interior de la partícula. Los estudios de potencial ζ muestran valores positivos a pH=3 mientras que a valores de pH= 10, la carga superficial es negativa, además de una tendencia de carga cercana a 0 a pH= 4. AMA se mantiene más en superficie que MAOB.

Existen interacciones entre las cargas de tipo intra-particular e inter-particular, debido a la heterogeneidad de la distribución de las cargas en la superficie; por lo tanto, existen floculaciones entre las partículas que pueden ser separadas por cambios en el pH.

Las micrografías muestran la formación de partículas semi-esféricas y descartan la formación de microgeles núcleo-coraza; esta observación además del incremento en la LCST del polímero, contribuye a la idea de que PEGMEM está dentro del microgel.

Los rendimientos obtenidos de los microgeles anfotéricos fueron del 70 al 80%. El rendimiento se vio favorecido en la serie de MAOB cuando este ácido fue combinado con DMAEM. Sin embargo, los microgeles no pudieron ser reconstituidos por lo que cualquier aplicación futura, debe ser practicada sin que los microgeles sean liofilizados.

La cuantificación de AMA, MAOB y DMAEM en la red polimérica fue posible por el método de titulación directa y en medio de disolución KCl 0.5 M. La incorporación de MAOB y AMA en la red disminuye conforme aumenta la concentración de DMAEM en la misma. DMAEM se incorpora menos cuando es sintetizada en conjunto con MAOB, que cuando esta copolimerizada con AMA.

CAPÍTULO VI
REFERENCIAS

- Ahn, S., Kasi, R., Kim, S., Sharma, N., Zhou, Y. (2008). Stimuli responsive polymer gels. *Soft Matter*, 4, 1151-1157.
- Arshady, R. (1992) Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey. *Colloid Polym Sci.*, 270, 717-732.
- Ballauf, Y., Lu, Y. (2007) “Smart” nanoparticles: preparation, characterization and applications. *Polymer*, 48, 1815-1823.
- Bertrand, N., Leroux, J. (2012) The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. *J Controlled Release*, 161, 152-163.
- Bradley, M., Ramos, J., Vincent, B. (2005) Equilibrium and kinetic aspects of the uptake of poly(ethylene oxide) by copolymer microgel particles of *N*-isopropylacrylamide and acrylic acid. *Langmuir*, 21 (4), 1209-1215.
- Bradley, M., Vincent, B., Burnett, G. (2007) Biocompatible, polyampholyte microgel particles. *Aust. J. Chem.*, 60, 646-650.
- Brazel, C., Peppas, N. (1995) Synthesis and Characterization of Thermo- and Chemomechanically Responsive Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) Hydrogels. *Macromolecules*, 28 (24), 8016-8020.
- Chang, C., Duan, B., Cai, J., Zhang L., (2010). Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *Eur Polym J.*, 46, 92-100.
- Chen, S., Jiang, L., Dan, Y. (2011) Preparation and thermal response behavior of poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) Microgels via soap-free emulsion polymerization based on AIBN initiator. *Journal of Applied Polymer Science*, 121, 3322-3331.
- Coelho, J., Ferreira, P., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A., Góis, J., et. al. (2010). Drug delivery systems: advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, 1, 164-209.
- Das, M., Kumacheva, E. (2006) From polyelectrolyte to polyampholyte microgels: comparison of swelling properties. *Colloid Polym Sci*, 284, 1073-1084.
- De Jong, W., Borm, P. (2008) Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3, (2), 133-149.
- Dong, L., Hoffman, A. (1991) A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *J. Control. Release*, 15, (2), 141-152.

- Fournier, E., Passirani, C., Montero-Menei, C., Benoit, J. (2003) Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*, 24, 3311-3331.
- Fujishige, S., Kubota, K., Ando, I. (1989) Phase transition of aqueous solutions of poly(*N*-isopropylacrylamide) and poly(*N*-isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.*, 93, 3311-3313.
- Geever, L., Nugent, M., Higginbotham, C. (2007) The effect of salts and pH buffered solutions on the phase transition temperature and swelling of thermosensitive pseudogels based on *N*-isopropylacrylamide. *J Mater Sci.*, 42, 9845-9854.
- Hirotsu, S., Hirokawa, Y., Tanaka, T. (1987) Volume-phase transition of ionized *N*-isopropylacrylamide gels. *J. Chem. Phys.*, 87 (2), 1392-1395.
- Hoare, T., Pelton, R. (2008) Charge-switching, amphoteric glucose-responsive microgels with physiological swelling activity. *Biomacromolecules*, 9, 733-740.
- Hoffman, A. (2002) Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Delivery Reviews*, 54, 3-12.
- Ito, S., Ogawa, K., Suzuki, H., Wang, B., Yoshida, R., Kokofuta, E. (1999). Preparation of thermosensitive submicrometer gel particles with anionic and cationic charges. *Langmuir*, 15, 4289-42940.
- Kabanov, A., Vinogradov, S. (2009) Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem. Int.*, 48, 5418-5429.
- Kamath, K., Park, K. (1993) Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, 11, 59-84.
- Kawaguchi, H. (2010) Stimuli-sensitive microhydrogels. En Ottenbrite, R., Park, K., Okano T. (Eds.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. (pp.107-117) Nueva York, E.U: Springer
- Kopecek, J., Yang, J. (2007) Hydrogels as smart biomaterials. *Polym Int.*, 56, 1078-1098.
- Kuckling, D., Adler, H., Arndt, K., Ling, L., Habicher, W. (2000) Temperature and pH dependent solubility of novel poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymers. *Macromol. Chem. Phys.*, 201, (2), 273-280.
- Kudaibergenov S. (1999) Recent advances in the study of synthetic polyampholytes in solutions. *Adv in Polymer Sci.*, 144, 115-197.

- Lee, T., Robinson, J. (2003). Sistema de suministro de drogas de liberación controlada. *Remington: Farmacia*. (20a. ed., pp. 1048-1079) Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana.
- Licea, A., Cornejo, J., Arndt, K., Picos, L., Serrano, A.. Estrategias y limitaciones en la preparación de Nanogeles sensibles a la temperatura y al pH. *Citado del XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México*. México 2010, 48-52.)
- Licea, A., Cornejo, J., Salgado, R., Santos, D., Lugo, E., Ramos, M., Arndt, K. (2007). Temperature and pH-sensitive polymers with hydrophobic spacers for the controlled delivery of drugs. *Macromol. Symp.*, 254, 292-299.
- Lugo, E., Licea, A., Cornejo, J., Arndt, K. Effect of method of preparation on properties of temperature and pH-sensitive gels: chemical crosslinking versus irradiation with e-beam. (2007) *Reactive & Functional Polymers*, 67, 67-80.
- Lugo, E. (2006) “Desarrollo de geles anfotéricos sensibles a la temperatura y al pH y su evaluación preliminar para la liberación controlada de fármacos” Tesis doctoral, Instituto Tecnológico de Tijuana. Tijuana, México.
- Mahlting, B., Cheval, N., Gohy, J.F., Fahmi, A. (2010) Preparation of gold nanoparticles under presence of the diblock polyampholyte PMAA-b- PDMAEMA. *J Polym Res*, 17, 579-588.
- Moselhy, J., Vira, T., Liu, FF., Wu, X. (2009) Characterization of complexation of poly (*N*-isopropylacrylamide-*co*-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) thermoresponsive cationic nanogels with salmon sperm DNA. *Int J of Nanomed.*, 4, 153-164.
- Ni, H., Kawaguchi, H., Endo, T. (2007) Preparation of amphoteric microgels of poly(acrylamide/methacrylic acid/dimethylamino ethylene methacrylate) with a novel pH-volume transition. *Macromolecules*, 40, 6370-6376.
- Oh, J., Drumright, R., Siegwart, D., Matyjaszewski (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.*, 33, 448-477
- Oishi, M., Nakamura, T., Jinji, Y., Matsuishi, K., Nagasaki, Y. (2009) Multi-stimuli-triggered release of charged dye from smart PEGylated nanogels containing gold nanoparticles to regulate fluorescence signals. *Mater. Chem.*, 19, 5909-5912.

- Park, T., Hoffman, A. (1992) Synthesis and characterization of pH- and/or temperature-sensitive hydrogels *J. Appl. Polym. Sci.*, 46 (4), 659.
- Park, K., Park, H. (1999) Smart hydrogels. En Salamone, J.C. (Ed.), *Concise polymeric Materials Encyclopedia* (pp.1476-1478) Boca Raton, E.U: CRC Press.
- Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.*, 50, 27-46.
- Peppas, N., Klier, J. (1991) Controlled release by using poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *J Controlled Release*, 16, 203-214.
- Qiu Y., Park, K. (2001). Environment-sensitive hydrogels form drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, 53, 321-339.
- Roy, I., Gupta, M. (2003) Smart polymeric materials: emerging biochemical applications. *Chem Biol.*, 10, 1161-1171
- Salgado, R. (2003) “*Nuevo geles inteligentes sensibles a la temperatura y al pH conteniendo derivados metacrílicos con espaciadores hidrofóbicos*” Tesis doctoral, Instituto Tecnológico de Tijuana. Tijuana, México.
- Salgado, R. (2011, Octubre). *Clasificación de reacciones de polimerización* [diapositivas de PowerPoint] Clase de Macromoléculas bajo la supervisión del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, México.
- Sassi, A., Shaw, A., Han, S., Blanch, H., Prausnitz, J. (1996) Partitioning of proteins and small biomolecules in temperature- and pH-sensitive hydrogels. *Polymer*, 37 (11), 2151-2164.
- Scarpa, J., Mueller, D., Klotz, I. (1967) Slow hydrogen-deuterium exchange in non- α -helical polyamide. *Journal of the American Chemical Society*, 89, (24), 6024-6030.
- Schmaljohann, D. (2006) Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1655-1670.
- Schott, H. (2003). *Dispersiones Coloidales. Remington: Farmacia.* (20a. ed., pp. 334-364) Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana.

- Serrano, A., Cornejo, J., Licea, A. (2012) Synthesis of pH and temperature sensitive core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *J Coll. and Int. Sci.*, 369, 82-90.
- Serrano, A. (2011) “*Síntesis de nanogeles núcleo-coraza sensible a la temperatura y al pH para el cargado y la liberación de fármacos*” Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Baja California. Tijuana, México.
- Seymour, L., Duncan, R., Strohm, J., Kopecek, J. (1987) Effect of molecular weight (Mw) of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J Biomed. Mater Res.*, 21, 1341–1358.
- Swarbrick, J., Rubino J., Rubino O. (2003). *Dispersiones de partículas gruesas. Remington: Farmacia.* (20a. ed., pp. 365-385) Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana
- Takeoka, Y., Berker, A., Du, R., Enoki, T., Grosberg, A., Kardar, M., Oya, T., Tanaka, K., Wang, G., Yu, X., Tanaka, T. (1999) First order phase transition and evidence for frustration in polyampholytic gels. *Phys Rev Lett.*, 82 (24), 4863-4865.
- United Nations Environment Programme Chemical Branch. OECD Initial assessment reports for high production volume chemicals, Screening Information Datasets (SIDS). Última actualización 09 de enero de 2013 (Consultado el 15 de Octubre de 2013). Fuente: <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDIDS/79414.pdf>
- United Nations Environment Programme Chemical Branch. OECD Initial assessment reports for high production volume chemicals, Screening Information Datasets (SIDS). Última actualización 09 de enero de 2013 (Consultado el 15 de Octubre de 2013). Fuente: <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDIDS/DIMETHYLAMINO.pdf>
- Vijay, S., Sati, O., Majumdar, D. (2010) Acrylic acid-methyl methacrylate copolymer for oral prolonged drug release. *J Mater Sci: Mater Med.*, 21, 2583-2592.
- Wadajkar, A., Koppolu, B., Rahimi, M., Nguyen, K. (2009) Cytotoxic evaluation of *N*-isopropylacrylamide monomers and temperatura-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) -nanoparticles. *J Nanopart Res.*, 11, 1375-1382.
- Wen, S., Stevenson, W. (1993) Synthetic pH sensitive polyampholyte hydrogels: a preliminary study. *Colloid and Polymer Sci.*, 271, (1), 38-49.

- Witcherle, O. (1978) Soft contact lenses, (Ed) Ruben M. Wiley, New York, 1978, pp. 3-5.
- Witcherle, O., Lim, D. (1960) Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 18, 185-117.
- Yamauchi, A. (2001). Gels: Introduction. En Osada, Y., Kajiwara K. (Eds.) *Gels Handbook*. (pp. 4-12) San Diego, E.U: Academic Press
- Zetasizer nano series user manual, mano317 núm. 4.0, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido, 2008.

CAPÍTULO VII
ANEXOS

ANEXO VII.4 CÁLCULOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE MAOB.

Datos

Formula de monómero: $C_{11}H_{10}O_4$

Peso molecular: 206 g/mol

Peso recuperado: 6.2246 g

Rendimiento teórico:

$$6.91 \text{ g Ac. Salicilico} \frac{1 \text{ mol de Ac. sal}}{138 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{Ac. sal}} \frac{1 \text{ mol MAOB}}{1 \text{ mol Ac. sal}} \frac{206 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{MAOB}}{1 \text{ mol de MAOB}} = 10.3 \text{ g}$$

Rendimiento experimental:

$$\frac{6.2246 \text{ g} \cdot 100\%}{10.3 \text{ g}} = 60.433\%$$

ANEXO VII.5 CÁLCULOS PARA EL RENDIMIENTO DE MICROPARTÍCULAS

Síntesis	V (mL)	w (g)	[C ₂] (g/mL)	[C ₁] (g/mL)	R (%) [C ₁ *100 / C ₂]
Controles					
Ácido 0: DMAEM 0	20	0.23	0.01150	0.01341	85.72
Ácido 0: DMAEM 6.6	17	0.1725	0.01015	0.01427	71.23
MAOB 8.1: DMAEM 0	20	0.1614	0.00807	0.01690	47.75
AMA 8.1: DMAEM 0	20	0.2242	0.01121	0.01387	80.78
MAOB:DMAEM					
8.1: 13.27	20	0.235	0.01175	0.01565	75.08
8.1: 8.1	20	0.2228	0.01114	0.01567	71.09
6.6: 6.6	20	0.235	0.01175	0.0147	79.89
AMA: DMAEM					
8.1: 6.6	20	0.2302	0.01151	0.01475	78.03
16.2: 6.6	20	0.22	0.011	0.01527	72.03
6.6: 6.6	20	0.227	0.01135	0.01473	77.21
V= Volumen liofilizado					
w= peso de sólidos recuperados					
C ₁ = Concentración original (asumiendo un 100% de polimerización)					
C ₂ = Concentración de la muestra liofilizada.					
R= Rendimiento					

ANEXO VII.6 CÁLCULOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MAOB Y AMA

Datos

Concentración de la solución titulante de KOH: 0.848 N

Peso molecular del AMA: 86.09 g/mol

Peso molecular de MAOB: 206 g/mol

Formulas

Peso (w) del ácido incorporado

De acuerdo a la formula de molaridad (M):

$$M = \frac{n}{V}$$

Donde:

n Moles

V Volumen (en litros)

Despejando n de la formula y asumiendo que $M = N$, quedaría:

$$mg \text{ de ácido} = V \cdot PM \cdot N$$

Donde:

V Volumen (ml) de titulante consumidos en el punto de equivalencia de la grafica de titulación.

PM Peso molecular del acido problema.

N Concentración del titulante utilizado.

Porcentaje de rendimiento (%R)

Para obtener el %R, es necesario primero calcular el porcentaje teórico de ácido esperado en la red (%_{Teórico}) y el porcentaje real (%_{Real}):

$$\%_{Teórico} = \frac{w MAOB_1}{w \text{ de solidos totales agregados}} \times 100$$

Donde:

w MAOB₁ Peso del MAOB (mg) añadido a la reacción inicial.

$$\%_{Real} = \frac{w MAOB_2}{w \text{ muestra titulada}} \times 100$$

Donde:

w MAOB₂ Peso del MAOB (mg) obtenidos de los cálculos de titulación.

$$\%R = \frac{\%_{Real}}{\%_{Teórico}} \times 100$$

Cálculos y resultados

MAOB 8.1: DMAEM 0

$$\text{mg MAOB} = (0.14 \text{ mL})(206 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 2.36$$

$$\%_{Teórico} = (68.80 \text{ mg}/901.8 \text{ mg}) 100 = 7.63$$

$$\%_{Real} = (2.36 \text{ mg}/40.60 \text{ mg}) 100 = 5.81$$

$$\%R = (5.81/7.63) 100 = 76.14$$

MAOB 8.1: DMAEM 13.2

$$\text{mg MAOB} = (0.07 \text{ mL})(206 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 1.2228$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (69.4 \text{ mg} / 835 \text{ mg}) 100 = 8.31$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.2228 \text{ mg} / 40.2 \text{ mg}) 100 = 3.04$$

$$\%R = (3.04 / 8.31) 100 = 36.58$$

MAOB 8.1: DMAEM 8.1

$$\text{mg MAOB} = (0.095 \text{ mL})(206 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 1.6595$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (67.5 \text{ mg} / 836.1 \text{ mg}) 100 = 8.0731$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.6595 \text{ mg} / 39.9 \text{ mg}) 100 = 4.16$$

$$\%R = (4.16 / 8.0731) 100 = 51.54$$

MAOB 6.6: DMAEM 6.6

$$\text{mg MAOB} = (0.05 \text{ mL})(206 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 0.8734$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (23 \text{ mg} / 784.1 \text{ mg}) 100 = 2.93$$

$$\%_{\text{Real}} = (0.8734 \text{ mg} / 40 \text{ mg}) 100 = 2.1836$$

$$\%R = (2.1836 / 2.93) 100 = 74.40$$

AMA 8.1: DMAEM 0

$$\text{mg AMA} = (0.222 \text{ mL})(86.09 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 1.6206$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (28.6 \text{ mg} / 740.1 \text{ mg}) 100 = 3.86$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.6206 \text{ mg} / 40 \text{ mg}) 100 = 4.05$$

$$\%R = (4.05/3.86)100 = 104.92$$

AMA 8.1: DMAEM 6.6

$$\text{mg AMA} = (0.097 \text{ mL})(86.09 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 0.7081$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (28.6 \text{ mg} / 786.7 \text{ mg}) 100 = 3.6354$$

$$\%_{\text{Real}} = (0.7081 \text{ mg} / 39.7 \text{ mg}) 100 = 1.7837$$

$$\%R = (1.7837/3.6354)100 = 49.064$$

AMA 16.2: DMAEM 6.6

$$\text{mg AMA} = (0.26 \text{ mL})(86.09 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 1.8981$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (57.6 \text{ mg} / 814.9 \text{ mg}) 100 = 7.07$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.8981 \text{ mg} / 40.1 \text{ mg}) 100 = 4.73$$

$$\%R = (4.73/7.07)100 = 66.90$$

AMA 6.6: DMAEM 6.6

$$\text{mg AMA} = (0.085 \text{ mL})(86.09 \text{ g/mol})(0.0848 \text{ N}) = 0.6205$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (23.2 \text{ mg} / 785.6 \text{ mg}) 100 = 2.95$$

$$\%_{\text{Real}} = (0.6205 \text{ mg} / 40 \text{ mg}) 100 = 1.55$$

$$\%R = (1.55/2.95)100 = 52.54$$

ANEXO VII.7 CÁLCULOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DMAEM

Datos

Concentración de la solución titulante de HCl: 0.1058 N

Peso molecular del DMAEM: 157.22 g/mol

Fórmulas

Peso (w) De la base incorporado

De acuerdo a la formula de molaridad (M):

$$M = \frac{n}{V}$$

Donde:

n Moles

V Volumen (en litros)

Despejando n de la formula y asumiendo que $M = N$, quedaría:

$$mg \text{ de ácido} = V \cdot PM \cdot N$$

Donde:

V Volumen (ml) de titulante consumidos en el punto de equivalencia de la grafica de titulación, este dato es el valor de x cuando $y=0$

$$y = \Delta[H^+] = mx + b$$

$$x = mL \text{ HCl} = y - b / m$$

Cuando $x=0$, $y = - b / m$

PM Peso molecular de la base problema.

N Concentración del titulante utilizado.

Porcentaje de rendimiento (%R)

Para obtener el %R, es necesario primero calcular el porcentaje teórico de base esperado en la red (%_{Teórico}) y el porcentaje real (%_{Real}):

$$\%_{Teórico} = \frac{w \text{ DMAEM}_1}{w \text{ de solidos totales agregados}} \times 100$$

Donde:

$w \text{ DMAEM}_1$ Peso del DMAEM (mg) añadido a la reacción inicial.

$$\%_{Real} = \frac{w \text{ DMAEM}_2}{w \text{ muestra titulada}} \times 100$$

Donde:

$w \text{ DMAEM}_2$ Peso del DMAEM (mg) obtenidos de los cálculos de titulación.

$$\%R = \frac{\%_{Real}}{\%_{Teórico}} \times 100$$

Cálculos y resultados

Ácido 0: DMAEM 6.6

$$y = 0.007x - 0.0002$$

$$R^2 = 0.997$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.0286$

$$\text{mg DMAEM} = (0.0286 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1.053 \text{ N}) = 0.4730$$

$$\%_{Teórico} = (44 \text{ mg} / 760.1 \text{ mg}) 100 = 5.7887$$

$$\%_{\text{Real}} = (0.4730 \text{ mg} / 18.2 \text{ mg}) 100 = 2.5989$$

$$\%R = (2.5989 / 5.7887) 100 = 44.90$$

MAOB 8.1: DMAEM 13.2

$$y = 0.0041x - 0.0003$$

$$R^2 = 0.9936$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.0732$

$$\text{mg DMAEM} = (0.0732 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1087 \text{ N}) = 1.25$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (85 \text{ mg} / 835 \text{ mg}) 100 = 10.1796$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.25 \text{ mg} / 40 \text{ mg}) 100 = 3.126$$

$$\%R = (1.71 / 10.1796) 100 = 30.71$$

MAOB 8.1: DMAEM 8.1

$$y = 0.0061x - 0.0002$$

$$R^2 = 0.999$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.03278$

$$\text{mg DMAEM} = (0.0327 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1087 \text{ N}) = 0.56$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (52.8 \text{ mg} / 836.1 \text{ mg}) 100 = 6.3150$$

$$\%_{\text{Real}} = (0.56 \text{ mg} / 40.4 \text{ mg}) 100 = 1.387$$

$$\%R = (1.387/6.315)100 = 21.96$$

MAOB 6.6: DMAEM 6.6

$$y = 0.0049x - 0.0002$$

$$R^2 = 0.997$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.0408$

$$\text{mg DMAEM} = (0.0408 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1087 \text{ N}) = 0.3815$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (44.4 \text{ mg} / 784.4 \text{ mg}) 100 = 5.6603$$

$$\%_{\text{Real}} = (0.3815 \text{ mg} / 40.1 \text{ mg}) 100 = 0.9515$$

$$\%R = (0.9515/5.6603)100 = 17.52$$

AMA 8.1: DMAEM 6.6

$$y = 0.0061x - 0.0005$$

$$R^2 = 0.9988$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.08196$

$$\text{mg DMAEM} = (0.08196 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1087 \text{ N}) = 1.40$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (44 \text{ mg} / 786.7 \text{ mg}) 100 = 5.593$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.40 \text{ mg} / 40.3 \text{ mg}) 100 = 3.476$$

$$\%R = (3.476/5.593)100 = 62.15$$

AMA 16.2: DMAEM 6.6

$$y = 0.0043x - 0.0004$$

$$R^2 = 0.9994$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.093$

$$\text{mg DMAEM} = (0.093 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1087 \text{ N}) = 1.58$$

$$\%_{\text{Teórico}} = (42.4 \text{ mg} / 814.9 \text{ mg}) 100 = 5.2030$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.58 \text{ mg} / 39.9 \text{ mg}) 100 = 3.984$$

$$\%R = (3.984 / 5.2030) 100 = 76.57$$

AMA 6.6: DMAEM 6.6

$$y = 0.005x - 0.0004$$

$$R^2 = 0.9972$$

Cuando $x = 0$, $y = 0.08$

$$\text{mg DMAEM} = (0.08 \text{ mL})(157.22 \text{ g/mol})(0.1087 \text{ N}) = 1.3671$$

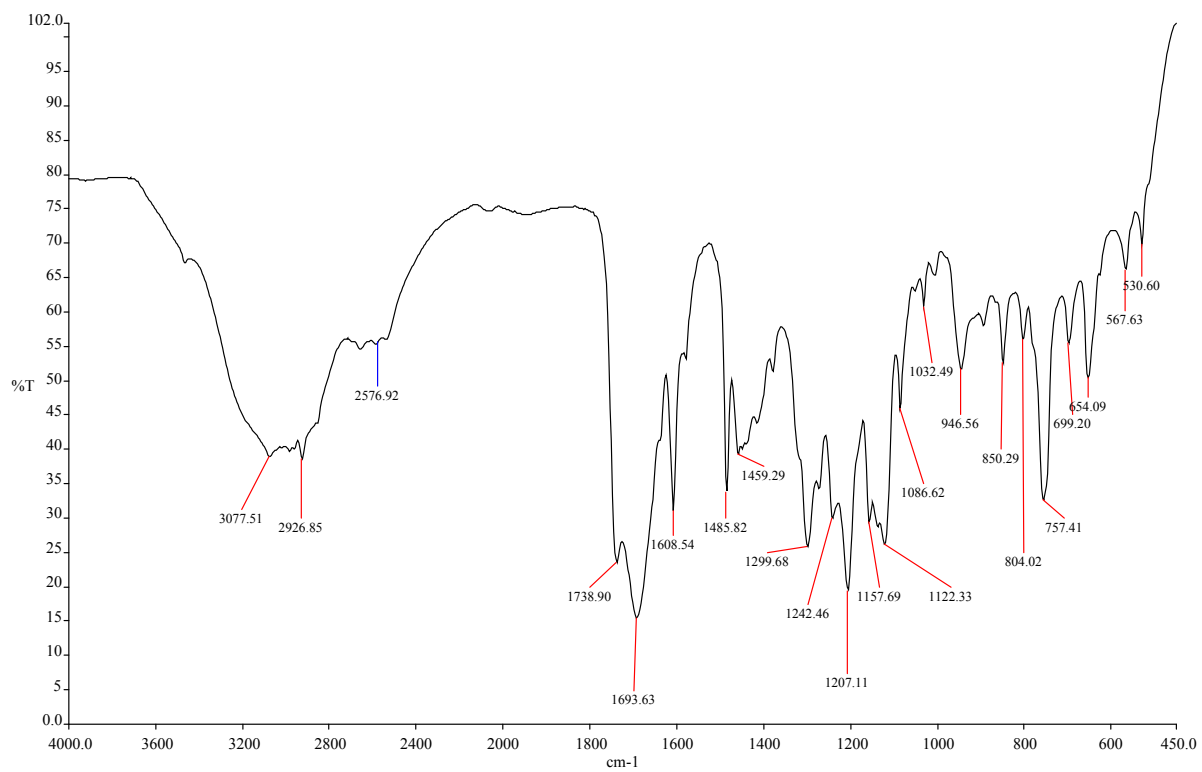
$$\%_{\text{Teórico}} = (44 \text{ mg} / 785.6 \text{ mg}) 100 = 5.6$$

$$\%_{\text{Real}} = (1.3671 \text{ mg} / 40.1 \text{ mg}) 100 = 3.4094$$

$$\%R = (3.4094 / 5.6) 100 = 60.89$$

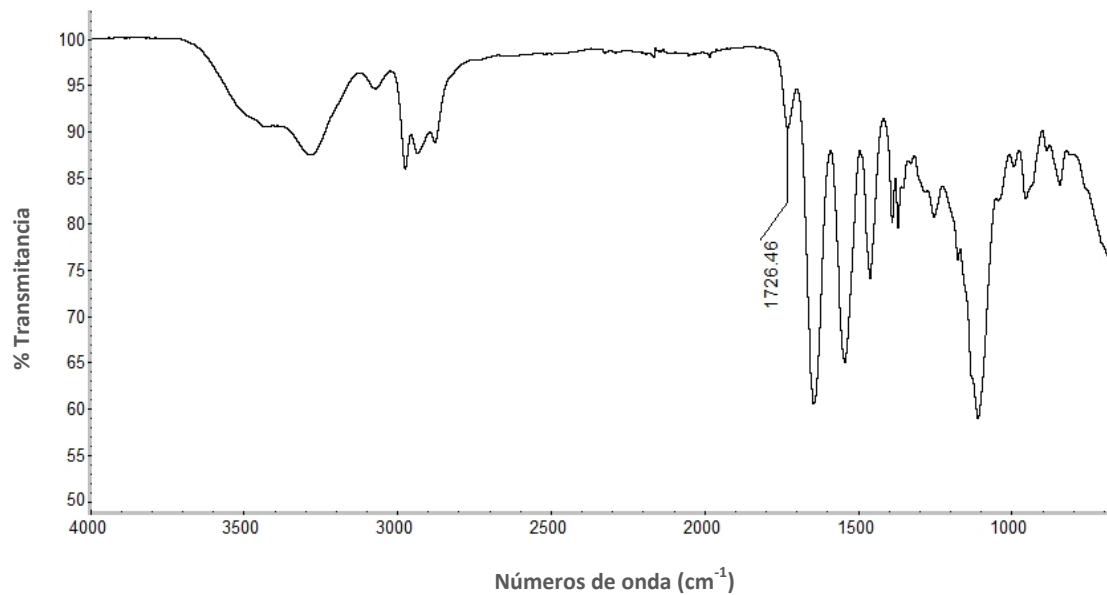
ANEXO VII.8

ESPECTRO DE FT-IR DE MAOB

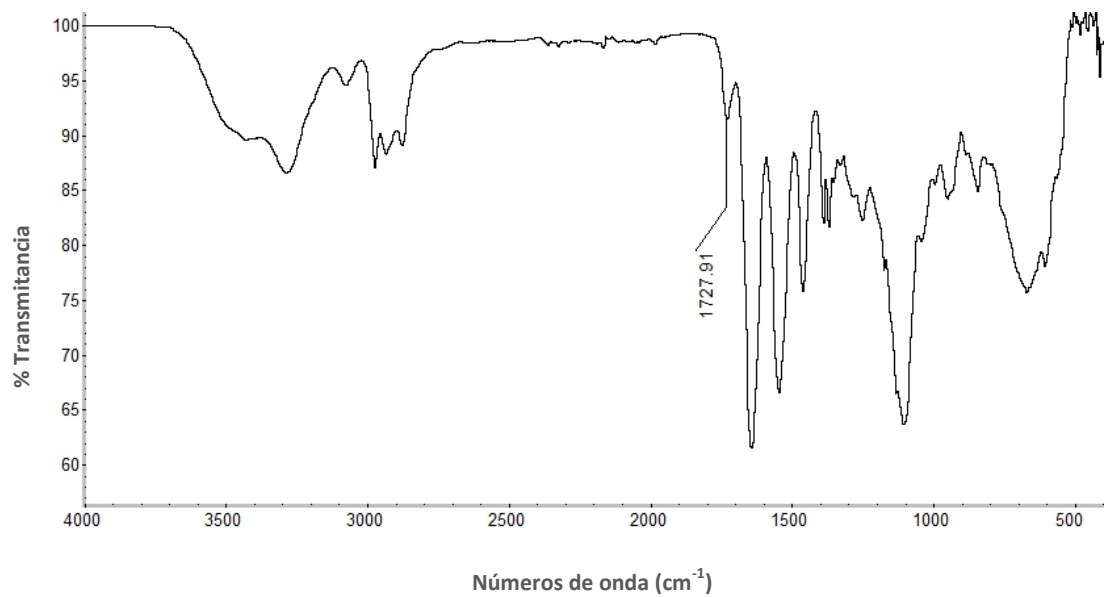


ANEXO VII.9 ESPECTROS DE IR DE MICROGELES ANFOTÉRICOS

VII.9.1 MAOB 8.1: DMAEM 13.2

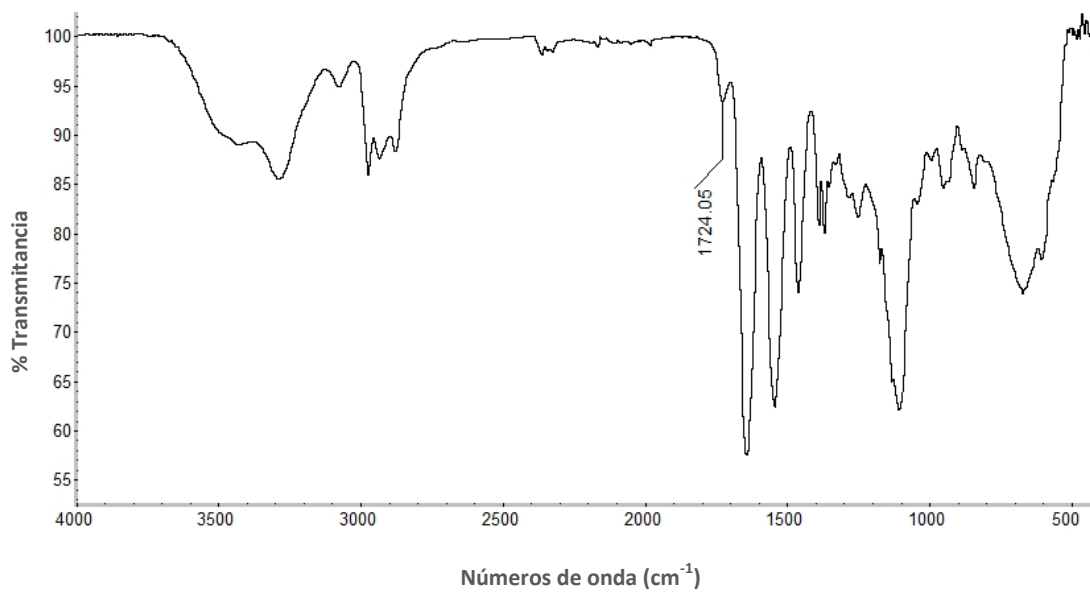


VII.9.2 MAOB 8.1: DMAEM 8.1



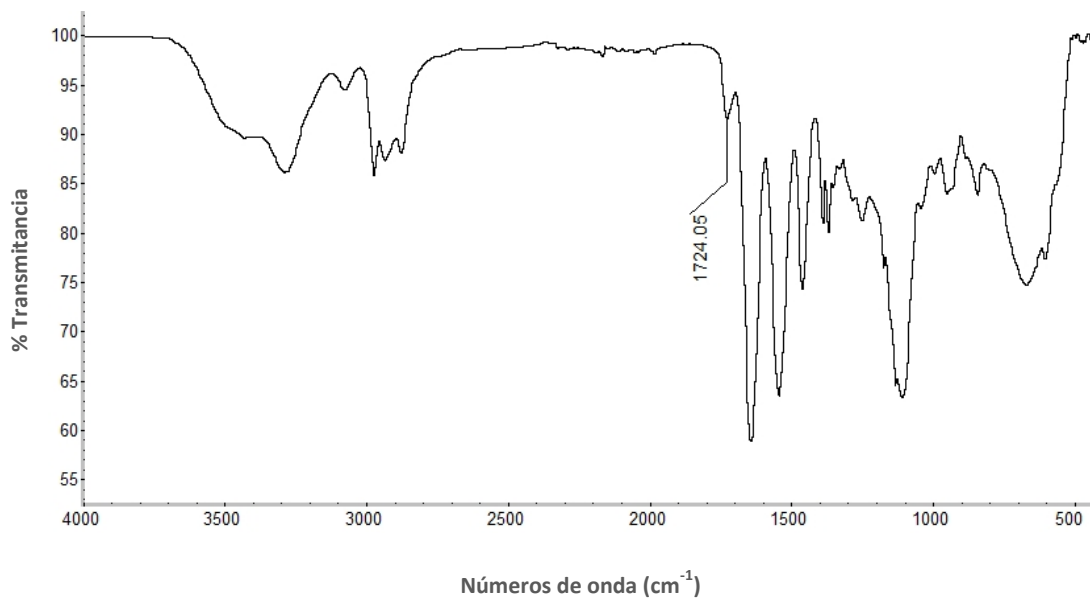
VII.9.3

MAOB 6.6: DMAEM 6.6

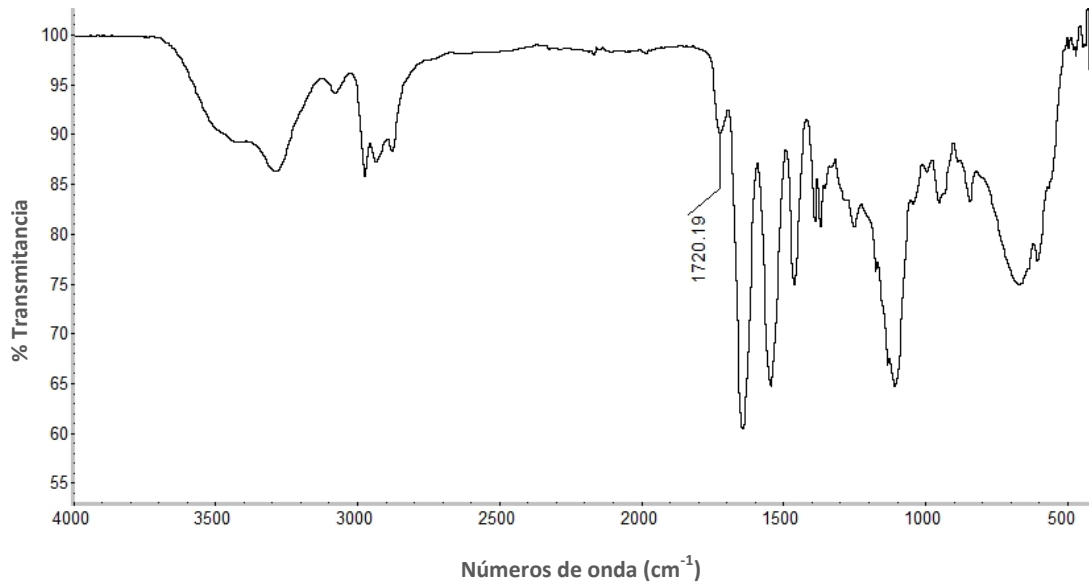


VII.9.4

AMA 8.1: DMAEM 6.6



VII.9.5 AMA 16.2: DMAEM 6.6



VII.9.6 AMA 6.6: DMAEM 6.6

