



**Universidad Autónoma de Baja California**  
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO  
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**DESARROLLO DE UN SISTEMA POLIMÉRICO (PEG-PVP)  
PARA EL TRANSPORTE Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE  
FÁRMACOS CONTRA EL CÁNCER DE PIEL**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN INGENIERÍA**

**PRESENTA**

**Carlos Alberto Soto Robles**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Priscy Alfredo Luque Morales**

**Ensenada, Baja California, México, Julio 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**DESARROLLO DE UN SISTEMA POLIMÉRICO (PEG-PVP) PARA EL  
TRANSPORTE Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS CONTRA  
EL CÁNCER DE PIEL**

**TESIS**

Que para obtener el grado de MAESTRO EN INGENIERÍA presenta:

**Carlos Alberto Soto Robles**

Aprobada por:



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Director de tesis



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez  
Codirector de tesis



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez  
Miembro del comité




Dra. María de los Angeles Cosío León  
Miembro del comité

Ensenada, Baja California, México, Julio, 2017.

**RESUMEN** de la tesis de **CARLOS ALBERTO SOTO ROBLES** presentada como requisito parcial para la obtención del grado MAESTRO EN INGENIERÍA del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México, Julio del 2017.

**Desarrollo de un sistema polimérico (PEG-PVP) para el transporte y liberación controlada de fármacos contra el cáncer de piel**

*Aprobada por:*

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez  
Codirector de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Director de tesis

**Resumen:**

En este trabajo se presenta el estudio de la combinación de polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP) con diferentes relaciones en masa para la liberación controlada de indometacina y 5-fluorouracilo respectivamente, como posible tratamiento para el cáncer de piel. Los materiales sintetizados se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido (*STEM por sus siglas en inglés Scanning Transmission Electron Microscopy*), Espectrometría Infrarroja por Transformación de Fourier (*FT-IR por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y Difracción de rayos X (*XRD por sus siglas en inglés X-ray Diffraction*). Los materiales poliméricos de PEG-PVP cargados con indometacina y 5-fluorouracilo presentan una morfología en forma esférica con estructura micelar. La carga del fármaco en el sistema PEG-PVP se realizó a una relación de masa 1:10 (fármaco: polímero) a través de la técnica de absorción en solución. La liberación *in-vitro* de los fármacos se investigó utilizando el método de diálisis y la concentración de fármaco liberado se determinó mediante espectrometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

**Palabras clave:** Polietilenglicol (PEG); Polivinilpirrolidona (PVP); Indometacina; 5-fluorouracilo; Administración de fármacos; STEM; FT-IR.

**“La ciencia no sólo es una disciplina de la razón,  
sino también del romance y de la pasión”.**

Stephen Hawking.

## ***Dedicatoria***

*A dios por su voluntad, bondad, por brindarme salud y permitirme alcanzar mis objetivos, gracias por dejarme llegar hasta este punto de mi vida.*

*A mis padres, Rosario Elena y Guadalupe Isidro, por ser sinónimos de perseverancia, constancia, pasión, apoyo y demás valores que siempre me han inculcado con su ejemplo, haciéndome ver que continuamente habrá una forma de salir adelante. A ustedes por su amor.*

*A mis hermanos, Juan Francisco y Cesar Paul por su compañía y apoyo, siendo fuente de inspiración, los quiero mucho, mi más grande admiración para ustedes.*

*Al resto de mi familia, la cual siempre me ha brindado su apoyo, consejos y motivaciones, llenándome de fortaleza en el transcurso de mi vida.*

*A mi sobrina Valeria Soto Velandia por llegar a la familia y llenarnos de felicidad.*

*A Karla Monjaraz por su paciencia, apoyo, amistad e impulso para seguir adelante, pero, sobre todo por su amor.*

*A mis amigos por acompañarme, por sus consejos y en especial por su apoyo a cada momento, a todos ustedes muchas gracias.*

*A mis profesores por el tiempo que me dedicaron y por todas las enseñanzas, las cuales me han permitido llegar a este punto de mi vida académica y profesional.*

## ***Agradecimientos***

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido durante estos dos años, para llevar a cabo mis estudios de maestría dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI), lo que permitió la realización de este trabajo de tesis.*

*A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la Universidad Autónoma de Baja California, por brindarme las herramientas y facilidades para llevar a cabo mis estudios.*

*A mi asesor el Dr. Priscy Alfredo Luque Morales por su paciencia, consejos y apoyo para la realización de este trabajo, además, de brindarme la oportunidad y confianza de colaborar en su grupo de investigación.*

*A la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez por su asesoría en el desarrollo de este proyecto, además, por su valioso apoyo dentro y fuera de los laboratorios.*

*Al Dr. Alfredo Vilches Néstor por su asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo, especialmente en la parte de caracterización.*

*A la Dra. María Cosío y el Dr. Rubén Villarreal gracias por sus aportaciones y comentarios, porque permitieron enriquecer este trabajo.*

*A la M.C. Eurydice Carolina Arroyo del PCeIM-UNAM, por toda su ayuda y apoyo en la parte experimental.*

*Mi agradecimiento a todos mis compañeros por sus consejos, ánimos y paciencia a lo largo de estos dos años; y a mis profesores, por sus aportaciones y enseñanzas dentro y fuera de las aulas.*

## ÍNDICE TEMÁTICO

Dedicatoria .....	V
Agradecimientos .....	VI
Índice temático .....	VII
Lista de figuras .....	IX
Lista de tablas.....	X
Capítulo I. Introducción .....	1
Cáncer de piel.....	4
Fármacos y tratamientos para el cáncer de piel .....	5
Nanotecnología en la liberación de fármacos .....	8
Materiales poliméricos para la liberación controlada de fármacos .....	9
Objetivo general .....	12
Objetivos específicos .....	12
Capítulo II. Fundamentos y técnicas .....	13
Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier .....	14
Microscopía Electrónica de Transmisión- Barrido .....	16
Difracción de rayos X .....	19
Método de Diálisis para estudio de liberación .....	20
Capítulo III. Desarrollo experimental .....	22
Preparación de materiales poliméricos.....	23
Ensayos de toxicidad de materiales poliméricos.....	23
Difracción de rayos X .....	25
Carga de fármaco en el polímero .....	25
Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido .....	27
Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	28
Estudios de la liberación de fármacos .....	28

Curvas de calibración .....	30
Capítulo IV. Resultados y discusión .....	31
Preparación de materiales poliméricos: .....	32
Bioensayos de toxicidad.....	33
Difracción de rayos X (XRD) .....	34
Carga del fármaco en el polímero .....	35
Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) .....	36
Microscopía Electrónica de Transmisión- Barrido (STEM).....	41
Estudios de liberación controlada de fármacos .....	47
Capítulo V. Conclusiones .....	55
Bibliografía .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un sistema micelar- polimérico .....	10
Figura 2. Spectrum two FT-IR con UATR (Perkin Elmer) .....	14
Figura 3. Celda de Reflectancia Total Atenuada (Perkin Elmer) .....	16
Figura 4. Dispersión del haz de electrones en el STEM .....	16
Figura 5. Microscopio electrónico de transmisión. (JEOL) JEM-2100.....	18
Figura 6. Ilustración para la derivación de la ecuación de Bragg .....	19
Figura 7. D2 PHASER (Bruker) equipo utilizado para la difracción de rayos X .....	20
Figura 8. Esquema que representan el estudio de la cinética de liberación del fármaco desde los liposomas por el método de diálisis dinámica.....	21
Figura 9. Diagrama del procedimiento de carga del fármaco .....	26
Figura 10. Representación gráfica del sistema de liberación controlada de fármacos .....	29
Figura 11. Materiales poliméricos compuestos de PEG: PVP con diferente relación de masa: (a) P1, (b) P2 y (c) P3. ....	32
Figura 12. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> en presencia de materiales poliméricos PEG-PVP (P1, P2 y P3) .....	33
Figura 13. XRD de indometacina, 5-fluorouracilo, P1, P2 y P3.....	34
Figura 14. Materiales poliméricos cargados con indometacina (a) I1, (b) I2 y (c) I3; con 5-fluorouracilo (e) F1, (f) F2 y (g) F3 después de liofilizar.....	35
Figura 15. FT-IR de los materiales poliméricos P1, P2 y P3.....	38
Figura 16. FT-IR de los materiales poliméricos cargados con indometacina I1, I2 e I3 después de liofilizar y de indometacina pura .....	39
Figura 17. FT-IR Materiales poliméricos cargados con 5-fluorouracilo F1, F2 y F3 después de liofilizar y de 5-fluorouracilo puro .....	40

Figura 18. Micrografías STEM de materiales poliméricos (a) P1, (b) P2 y (c) P3....	43
Figura 19. Micrografías STEM de materiales poliméricos cargados con indometacina (a) I1, (b) I2 y (c) I3.....	44
Figura 20. Micrografías STEM de materiales poliméricos cargados con 5-fluorouracilo (a) F1, (b) F2 y (c) F3.....	45
Figura 21. Micrografías de STEM del material cargado con indometacina (a) y (b) que conciernen a la muestra I2; mientras que (c) y (d) corresponden a la muestra F2 de 5-fluorouracilo cargada en el material polimérico .....	46
Figura 22. Curva de calibración de indometacina.....	49
Figura 23. Curva de calibración 5-fluorouracilo.....	50
Figura 24. Gráfica de liberación acumulativa de indometacina (44 h).....	52
Figura 25. Gráfica de liberación acumulativa de 5-fluorouracilo (24 h) .....	54

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Preparaciones tópicas para el tratamiento de cáncer de piel y queratosis actínica. ....	5
Tabla 2. Características de los fármacos utilizados en los tratamientos de cáncer de piel y la queratosis actínica. ....	6
Tabla 3. Materiales utilizados para el transporte de 5-fluorouracilo en el tratamiento de distintas enfermedades. ....	7
Tabla 4. Composición de caldo de luria en 1 L de solución. ....	24
Tabla 5. Composición de medio agar EMB en 1 L de solución .....	24
Tabla 6. Notación de los materiales poliméricos cargados con indometacina y 5-fluorouracilo respectivamente. ....	27
Tabla 7. Composición de solución PBS (Solución stock 10X).....	28

Tabla 8. Relaciones de masa de los materiales poliméricos (P1, P2 y P3).....	32
Tabla 9. Longitud de onda máxima de los materiales involucrados en los estudios de liberación de fármaco.....	47
Tabla 10. Valores de absorbancia de indometacina en el punto máximo de absorción por UV-VIS.....	48
Tabla 11. Valores de absorbancia del 5-fluorouracilo en el punto máximo de absorción por UV-VIS.....	50

*CAPÍTULO I*

**INTRODUCCIÓN**

## Capítulo I. Introducción

En la actualidad, el cáncer es una de las causas que mayor número de muertes provoca a nivel mundial, debido a la falta de tratamientos más eficaces. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, en 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y se prevé que aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. Con estas cifras el cáncer se ha posicionado como la segunda causa de muerte en el mundo; tan solo en el 2015, ocasionó 8.8 millones de defunciones [1].

Dentro de este tipo de neoplasias (cáncer pulmonar, hepático, mamario, colorrectal, entre otros), el cáncer de piel se muestra como uno de los más comunes en las poblaciones blancas, presentando una tasa de incidencia creciente en todo el mundo; para este tipo de cáncer se pueden destacar dos tipos principalmente: melanoma y no melanoma, las cuales son de tipo proliferativo y se originan en nuestra cubierta cutánea, es decir, son un padecimiento desordenado de proliferación celular con el consecuente crecimiento, invasión y posible desarrollo de metástasis [2].

El tratamiento de todo tipo de enfermedades, entre las que se incluye el cáncer de piel, requieren de distintos tipos de tratamientos y medicamentos, sin embargo, la administración de los mismos presentan una serie de inconvenientes derivados del escaso control que se ejerce sobre los niveles del fármaco administrado y su efectividad [3, 4].

Con la firme idea de mejorar los tratamientos tradicionales, surge la nanomedicina, como una forma emergente de terapia que se centra en el suministro de fármacos alternativos y la mejora de la eficacia de los tratamientos; abriendo nuevas posibilidades para la medicina moderna [5, 6]. En los últimos años se ha observado un avance importante en esta rama, basada principalmente en el progreso de los materiales nanoestructurados para el transporte y liberación controlada de fármacos destinados al tratamiento de diversas enfermedades [7].

La Dra. Tessy López menciona que: “La generación de tecnologías de liberación controlada, usando materiales micro y nanoestructurados, tanto orgánicos como inorgánicos, son cada vez más necesarias en el área farmacéutica, ya que una liberación de este tipo disminuye los efectos tóxicos secundarios, aumentando el tiempo de actividad y protegiendo a los fármacos sensibles de los ataques enzimáticos o degradación ácida, buscándose con ello mayor calidad y efectividad en el suministro de los diferentes agentes terapéuticos”[8]. Dicho lo anterior se aprecia que la nanomedicina no es un campo exclusivo de una sola disciplina, al contrario, esta requiere de un trabajo en conjunto donde convergen distintas ramas del conocimiento como lo son: la Ingeniería, la Química, la Biología, la Medicina y la Ciencia de Materiales [9].

En síntesis, los sistemas dirigidos de administración de fármacos, han demostrado un gran potencial en el tratamiento del cáncer, los cuales podrían ser utilizados para resolver las limitaciones de la quimioterapia convencional, reduciendo la exposición del fármaco en el tejido sano [10, 11]. Estos sistemas pueden ser elaborados con una gran variedad de materiales y distribuciones; incluyendo polímeros, lípidos e incluso compuestos organometálicos, por mencionar algunos [12].

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la liberación del fármaco es influenciado generalmente por diversos factores, principalmente por el material del nanotransportador, el medio de liberación y el tipo de fármaco que se utiliza [13]. El material con el que se fabrican esta especie de nanotransportadores juega un papel importante para llevar a cabo una adecuada liberación, siendo los polímeros uno de los más prometedores en este tipo de aplicaciones.

Los polímeros han sido importantes en el avance de la tecnología de administración de fármacos al proporcionar la liberación controlada de agentes terapéuticos en dosis constantes durante largos períodos de tiempo, gracias a su gran variedad, versatilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, además, presentan la posibilidad de modular sus propiedades físico-químicas [14, 15]. Tales materiales han incluido en gran medida derivados de celulosa, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), ácido poli-láctico (PLLA, PLA), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), entre otros, en su mayoría sintéticos [16].

Por lo anterior, los objetivos y principios del diseño de este tipo de sistemas son de dos tipos principalmente: proporcionar una liberación local y extendida de los fármacos cargados para aumentar el efecto terapéutico; y para disminuir las reacciones adversas y preservar la bioactividad de los fármacos.

## **Cáncer de piel**

El cáncer de piel surge de la división anormal o mutación de las células de la piel, se puede clasificar en dos tipos en función de su origen:

1. Cáncer de piel melanoma.
2. Cáncer de piel no melanoma. Este puede ser de varios tipos, principalmente de células basales y escamosas, los cuales son los más comunes y suelen presentarse en personas mayores [17].

Casi el 90% de los casos de cáncer de piel son causados por la alteración del ADN en las células de piel, debido a los rayos UV seguido de fallas en el sistema de reparación de las mismas [18]. En general, llegan a existir múltiples factores de riesgo para el cáncer de piel entre los que se incluyen factores endógenos y exógenos. Los primeros pueden ser fototipo, la piel y el color de los ojos, número de nevus melanocíticos, la presencia de nevus displásicos, y antecedentes personales o familiares de cáncer de piel; y los endógenos están relacionados con el tipo y grado de exposición al sol acumulada, historia de quemaduras de sol y el comportamiento de protección [19].

Garden (2013) en su estudio acerca del cáncer de piel nos dice que: “El cáncer de piel es un problema de salud pública mundial preeminente, abarcando todas las etnias, sin importar estatus socioeconómicos, demográficos, región geográfica y cubre todo el ciclo de vida. Esta representa la neoplasia maligna más común en todo el mundo y su incidencia no muestra signos de estancamiento. La Sociedad Americana del Cáncer estima que más de 1.6 millones de nuevos casos reportados de tumor maligno cutáneo en 2012, y 12,190 muertes por cáncer de piel” [20].

## Fármacos y tratamientos para el cáncer de piel

Los diferentes tipos de tratamientos locales para este tipo de enfermedades se determinan con base en el tipo, tamaño, localización de la lesión, y la edad del paciente. Actualmente las principales estrategias de tratamiento son: la radioterapia y la cirugía. Pero también son alternativas las quimioterapias, terapia fotodinámica, quimioterapia tópica con retinoides, 5-fluorouracilo, diclofenaco sódico, imiquimod, entre otros fármacos [21].

Los fármacos que actualmente se utilizan en los tratamientos para enfermedades de la piel y queratosis actínica así como sus formulaciones químicas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparaciones tópicas para el tratamiento de cáncer de piel y queratosis actínica.

<b>Drogas</b>	<b>Formulación</b>	<b>Indicaciones y régimen de tratamiento</b>
<i>Alitretinoína</i>	<i>Panretin® (0.1% alitretinoína)</i>	<i>Queratosis actínica.</i>
<i>Diclofenaco sódico</i>	<i>Solaraze® (Diclofenaco de sodio 3%)</i>	<i>Queratosis actínica.</i>
<i>5- Fluorouracilo</i>	<i>Crema de Carac® Microsponge® (0.5% fluorouracilo)</i>	<i>Queratosis actínica</i>
	<i>Efudex® crema (5% fluorouracilo)</i>	<i>Queratosis actínica Enfermedad de Bowen; Carcinoma de células basales superficiales.</i>
	<i>Fluoroplex® (1% fluorouracilo)</i>	<i>Queratosis actínica</i>
<i>Fluorouracilo, ácido salicílico</i>	<i>Actikerall® (0.5% fluorouracilo y 10% de ácido salicílico)</i>	<i>Queratosis actínica. , Lesiones Hipertróficas palpables y/o gruesas..</i>
<i>Imiquimod</i>	<i>Aldara® 5% imiquimod,</i>	<i>Queratosis actínica Carcinoma basocelular superficial.</i>
	<i>Crema de Zyclara® 2.5% o 3.75% imiquimod</i>	<i>La queratosis actínica. No hipertrófica, no hiperqueratosis, lesiones visibles o palpables de la cabeza y la cara.</i>
<i>Mebutate Ingenol</i>	<i>Picato® 150 µg / g o 500 µg / g de mebutate ingenol</i>	<i>La queratosis actínica. No hiperqueratósicas, lesiones no hipertróficas.</i>

Los factores que definen la eficiencia del fármaco en los diferentes tratamientos contra las enfermedades, son su especificidad, además de sus propiedades intrínsecas como la solubilidad, el peso molecular, la constante de disociación acida ( $pK_a$ ) y coeficiente de partición aparente, las cuales intervienen sobre la forma de liberación, en la Tabla 2 se muestran las características de los fármacos utilizados en los tratamientos de cáncer de piel.

Tabla 2. Características de los fármacos utilizados en los tratamientos de cáncer de piel y la queratosis actínica.

Drogas	Peso molecular	Log <i>P</i>	Punto de fusión (°C)	Solubilidad	$pK_a$
Alitretinoína	300.4	4.7	190-191	Muy ligeramente soluble en solución acuosa	5.1
Diclofenaco Sódico	318.1	-	283 a 285	Poco soluble en agua	4.2
Fluorouracilo	130.1	-0.8	282	Poco soluble en agua	8.0, 13.0
Imiquimod	240.3	2.3	292-294	Prácticamente insoluble en agua	7.3
Mebutate Ingenol	430.5	2.0	154.1-156.8	Insoluble en agua	12.7

Virginia Sáez (2003) menciona que para la elección del fármaco se toman en cuenta sus características, ya que a medida que aumenta el peso molecular de estos, disminuye la constante de difusión, siendo este un aspecto importante para el encapsulamiento y liberación de fármacos [22], por consecuencia, uno de los que cumple con las características de bajo peso molecular e insolubilidad al agua, es el 5-fluorouracilo, el cual es estudiado en este trabajo, al igual que la indometacina como antiinflamatorio y agente modelo para evaluar el sistema polimérico que es utilizado como transportador y dosificador de fármacos.

### 5-fluorouracilo

Hasta el día de hoy se posiciona como uno de los quimioterapéuticos tópicos más estudiados y actúa bloqueando la síntesis del ADN por inhibición de la enzima timidilato sintetasa. Este fármaco está aprobado para el tratamiento del carcinoma basocelular superficial, a una concentración del 5% y aplicado dos veces al día un mínimo de 6 semanas, con una tasa de aproximada de curación del 93%. Pero como desventaja provoca una reacción inflamatoria local que puede ser intensa, sin embargo, se recomienda su uso por aplicación tópica para el tratamiento del carcinoma basocelular superficial, de tamaño pequeño, localizados en zonas de bajo riesgo o en pacientes que no puedan recibir tratamientos quirúrgicos [23].

Las estrategias de tratamiento para el cáncer de piel requieren una cuidadosa consideración, y hay muchos retos que superar. En la Tabla 3 se enlistan algunos estudios que indagan en la combinación de terapias y secuencias, para lograr mejores resultados, buscando un menor número de recurrencias y tratamientos por periodos más largos y efectivos en los pacientes.

Tabla 3. Materiales utilizados para el transporte de 5-fluorouracilo en el tratamiento de distintas enfermedades.

Nanotransporte	Fármaco	Aplicación	Año	Autor	Referencia
Lut-mPEG-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - $\alpha$ CD	5-Fluorouracilo	Pruebas Invitro C. colon	2016	Weixia Qing	[24]
Quitosano	5-Fluorouracilo +microondas	Enfermedades de la piel	2016	Asif Nawaz	[25]
Lecitina y poloxamer (liposomas)	5-Fluorouracilo	Enfermedades de la piel	2016	Rasha A. Khaliq	[26]
Ácido fólico-mPEG	5-Fluorouracilo	Cáncer colorrectal	2015	Van Minh Le	[27]
Nanoliposomas PEGilados	Resveratrol y 5-Fluorouracilo	Carcinoma de células escamosas	2014	Aarti Mohan	[28]
Carbopol y poloxamer	5-Fluorouracilo	Enfermedades de la piel	2014	Kumar Jain	[29]
Dextrano-Celulosa	5-Fluorouracilo	Enfermedades de la piel	2014	Ashish Garg	[30]

Fosfato de glicerol-Quitosano	5-Fluorouracilo	Cáncer de colon	2013	Bhavesh P. Depani	[31]
Nanoesferas de tirosina	5-fluorouracilo	Enfermedades de la piel	2013	Zheng Zhang	[32]
Nanogel de quitina	5-Fluorouracilo	Cáncer de piel	2013	M. Sabitha	[33]
Emulsiones sub-micrométricas	5-Fluorouracilo	Enfermedades de la piel	2012	Yaw Bin Huang	[34]

### **Nanotecnología en la liberación de fármacos**

Los productos nanométricos comercializados para otras enfermedades, exhiben actualmente una gran variedad de aplicaciones (regeneración tisular, implantes dentales, tratamiento de tumores, hipertermia, etc.). La aplicación de la nanotecnología para la administración de fármacos se espera que cambie ampliamente el panorama de las industrias farmacéuticas y biotecnológicas para el futuro previsible. El desarrollo de productos de la nanotecnología puede desempeñar un papel importante en la adición de un nuevo arsenal de agentes terapéuticos.

Con la finalidad de mejorar los tratamientos tradicionales, la nanotecnología ha prestado bastante atención a los diferentes sistemas de administración de fármacos para mejorar su solubilidad en algunos fármacos y disminuir la resistencia de las células cancerosas. Las estructuras de estos sistemas pueden incluir liposomas, micelas poliméricas, polímerosomas, hidrogeles, nanoemulsiones, nanopartículas poliméricas y algunos otros [35], ya que estos pueden llegar a superar algunas de las barreras o límites de muchos tratamientos tradicionales, desarrollándose incluso sistemas capaces de obtener las características y funciones deseables en respuesta a los estímulos externos, como iones, moléculas, temperatura y la luz, para la entrega de uno, dos o más agentes terapéuticos, incluyendo fármacos, genes y agentes funcionales a las células cancerosas [36].

Actualmente, se han desarrollado una serie de sistemas de administración cada uno de ellos con características particulares y variedad en sus materiales, sin embargo, uno de los materiales mayormente utilizados son los polímeros debido a la versatilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual los hace útiles y uno de

los principales candidatos para aplicaciones biomédicas, en este caso entrega de fármacos quimioterapéuticos.

### **Materiales poliméricos para la liberación controlada de fármacos**

La nanomedicina busca implementar el uso de micro y nanopolímeros que permitan desarrollar sistemas de transporte con alta especificidad y actividad, sin presentar efectos tóxicos y que además permitan la liberación controlada de agentes activos.

Durante las últimas dos décadas un esfuerzo considerable se ha dirigido hacia estos sistemas a través de múltiples estructuras de polímeros, con la finalidad de mejorar la especificidad, afinidad y sensibilidad de los tratamientos contra diversas enfermedades.

Los sistemas micelares estudiados más a fondo son aquellos conformados por polietilenglicol (PEG) como bloques hidrofílicos; una de las bondades de los nanopolímeros para su uso en farmacoliberación es su capacidad para encapsular e incrementar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua. Esta propiedad reside en la naturaleza anfifílica de los distintos bloques de copolímeros que por medio de auto ensamblaje [37] forman un núcleo hidrofóbico en la parte interna y una capa hidrofílica en el exterior, como se ve en la Figura 1.

La encapsulación en micelas poliméricas permite también incrementar las concentraciones acuosas de componentes bioactivos, prevenir su degradación durante la circulación, participar como agentes solubilizadores (reemplazando solventes altamente tóxicos) [38] y pueden ser funcionalizados para orientarlos a zonas específicas en el cuerpo humano [39].

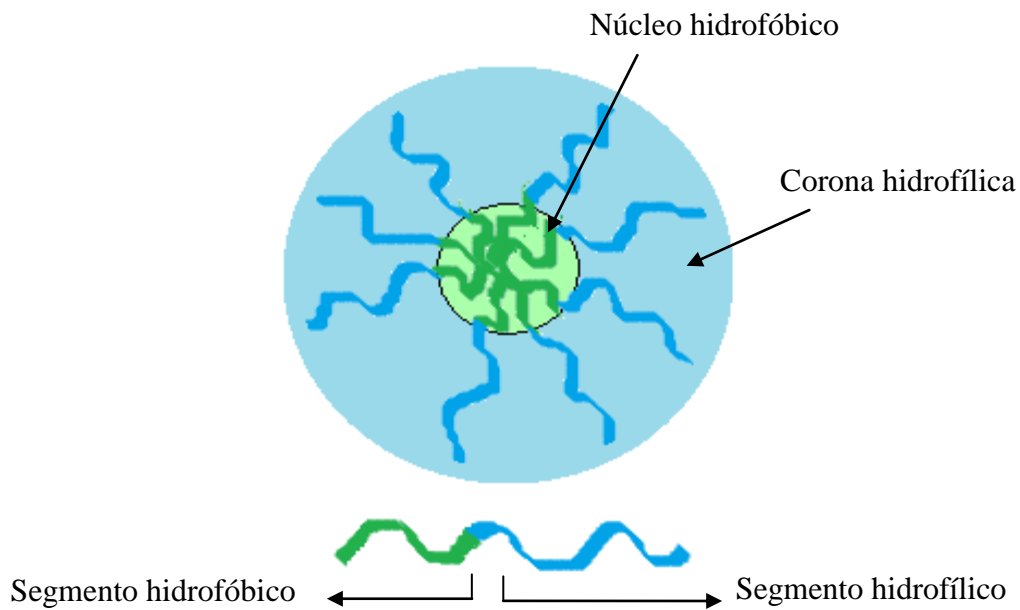


Figura 1. Representación esquemática de un sistema micelar- polimérico.

Un polímero para ser útil en una aplicación farmacéutica, debe tener una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) muy por encima de la temperatura ambiente, además de cumplir con otras propiedades tales como viscosidad, el volumen libre y resistencia a la tracción [40, 41]. Entre los más utilizados para el diseño de este tipo de sistemas se encuentran los polímeros solubles en agua tales como: polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular [42].

El PEG es utilizado debido a su bajo punto de fusión (aproximadamente  $55-60^{\circ}\text{C}$ ), su alta velocidad de solidificación, baja toxicidad, y bajo costo. Sin embargo, a concentraciones de fármaco más altas, los ingredientes farmacéuticos activos están presentes dentro de la dispersión del PEG en forma cristalina, o recristalizan en el tiempo y se ve afectada la liberación de los mismos.

Por otro lado, el PVP enfrenta menos problemas de estabilidad que el PEG; sin embargo, su alta temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) ( $150$  y  $180^{\circ}\text{C}$ ) limita su aplicabilidad por métodos de fusión. Con el fin de utilizar PVP como portador se utilizan mezclas con plastificantes (tales como PEG) para disminuir su  $T_g$  [43, 44].

### Polietilenglicol (PEG)

La fórmula química es representada como  $H(OCH_2-CH_2)_nOH$ . Este polímero presenta propiedades hidrofílicas, neutras y no inmunogénico [45], debido a su amplia disponibilidad, no toxicidad, biodegradabilidad y bajo precio, el PEG se ha utilizado en diversas áreas de la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos [46]. Los bloques PEG se han combinado con ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) para generar un copolímero PEG-PLGA los cuales han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) debido a su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad [47].

### Polivinilpirrolidona (PVP)

Es un polímero hidrofílico de fórmula química  $(C_6H_9NO)_n$ ; que por sí mismo tiene la ventaja de una alta temperatura de transición vítrea, lo que aumenta su estabilidad a largo plazo en dispersión sólida, además es altamente soluble en agua y mejora la liberación de ingredientes farmacéuticos activos. Sin embargo, su mayor desventaja en cuanto a la estabilidad a largo plazo es su alta higroscopia; Las dispersiones sólidas formuladas con PVP pueden absorber grandes cantidades de agua de la atmósfera, lo cual puede actuar como plastificante. El agua absorbida puede inducir también a una fase amorfa de separación o recristalización de los ingredientes farmacéuticos activos [48].

El PVP es comúnmente seleccionado como un compuesto polimérico modelo debido a su biocompatibilidad y su comportamiento termo-sensible, posee excelentes propiedades termo-físicas lo cual lo vuelve muy útil para la industria farmacéutica y cosmética. Dentro de los usos comunes para el PVP se pueden mencionar la protección de cultivos, producción de detergentes, producción de acero, en la industria eléctrica y ampliamente usado para la síntesis de hidrogeles [49].

## **Objetivo general**

Desarrollar un sistema polimérico basado en polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP) para el transporte y liberación controlada de fármacos utilizados en el tratamiento de carcinoma basocelular.

## **Objetivos específicos**

1. Sintetizar materiales de PEG-PVP variando sus relaciones en masa.
2. Evaluar toxicológicamente los materiales poliméricos de PEG-PVP mediante bioensayos utilizando *Escherichia coli* (*E. coli*).
3. Realizar ensayos para cargar el fármaco en el material polimérico.
4. Realizar las pruebas de liberación del fármaco por medio de la técnica de diálisis y elaborar las curvas de calibración correspondientes a cada fármaco para conocer la concentración liberada.
5. Caracterizar los materiales por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión-Barrido (STEM), Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR), y Difracción de Rayos X (XRD).

*CAPÍTULO II*

**FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS**

## Capítulo II. Fundamentos y Técnicas

### Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier

Desde el punto de vista de las aplicaciones e instrumentación, resulta favorable dividir el espectro infrarrojo en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano. Las técnicas y las aplicaciones de cada una de estas suelen variar considerablemente dependiendo de la información que se requiera obtener. La región completa del espectro infrarrojo comprende la radiación con números de onda en un rango de 12,800 y  $10\text{ cm}^{-1}$  [50].

Existen dos tipos de espectrómetros infrarrojos, los dispersivos y los de transformada de Fourier. El equipo con el cual se cuenta en el laboratorio (Figura 2) es de transformada de Fourier y trabaja de los 8300 a  $350\text{ cm}^{-1}$ , es decir en el infrarrojo medio y una parte del lejano; ampliamente utilizado debido a la información cualitativa y cuantitativa que proporcionan sobre la naturaleza del enlace químico y las redes cristalinas. Este equipo está compuesto principalmente por tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector [51].



Figura 2. Spectrum two FT-IR con UATR (Perkin Elmer).

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros; distinguiéndose dos categorías básicas de vibraciones: las de tensión o de flexión derivados de la absorción de la luz [52].

Las diferentes posiciones de las bandas de absorción en el espectro proporcionan información sobre la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos en una molécula y, en conjunto, el espectro constituye una huella muy particular que puede utilizarse para determinar la identidad de la muestra [53, 54]. Dicho lo anterior, la diferencia entre dos espectros indica que las dos muestras están formadas por diferentes componentes.

Los espectros de infrarrojo pueden llegar a utilizar otros accesorios con la finalidad de obtener mejores resultados, dependiendo de la naturaleza de las muestras. En el equipo con el cual se está trabajando emplea un accesorio de Reflectancia Total Atenuada Universal (*UATR, por sus siglas en inglés*) para las muestras poliméricas, considerando que es ideal para el análisis de sólidos, líquidos, pastas y geles [54, 55].

La espectroscopia de Reflectancia Total Atenuada (*ATR, por sus siglas en inglés*) funciona especialmente en muestras opacas o demasiado gruesas para las mediciones de transmisión, proporcionando información sobre las propiedades superficiales y condiciones de los materiales, teniendo en cuenta que puede ser útil para mediciones cualitativas y cuantitativas.

Esta técnica utiliza el fenómeno de reflexión interna total, de manera que, un haz de radiación atraviesa un cristal (hay una variedad de cristales utilizados para las mediciones ATR) y sufre una reflexión interna total a través de este, como se muestra en la Figura 3. La distancia que la onda se extiende desde la superficie del cristal depende del material que se está utilizando. La onda evanescente que se forma se desintegra rápidamente de la superficie del cristal, por lo tanto, se debe mantener un buen contacto entre el cristal y la muestra cuando se realizan mediciones ATR. La profundidad de penetración para ATR es una función de la longitud de onda, el índice de refracción del cristal que se utiliza y el ángulo de incidencia [55].

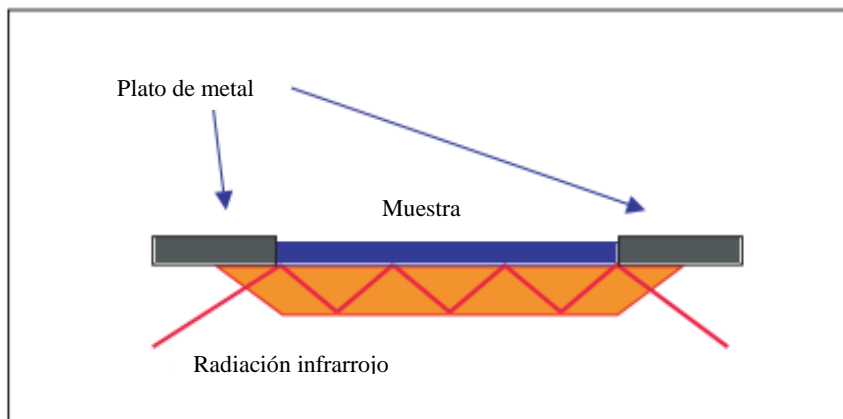


Figura 3. Celda de Reflectancia Total Atenuada (Perkin Elmer) [55].

### Microscopía Electrónica de Transmisión- Barrido

La microscopía electrónica de transmisión es muy útil para estudiar materiales de dimensiones nanométricas o submicrónicas, siendo parte importante para la caracterización estructural. El microscopio electrónico utiliza un haz de electrones suficientemente acelerado, de manera que al impactar con una muestra delgada y favorablemente preparada, genera una serie de señales (Figura 4) relacionadas con la estructura del material investigado, las cuales se seleccionan por separado para obtener diferentes datos analíticos [56].

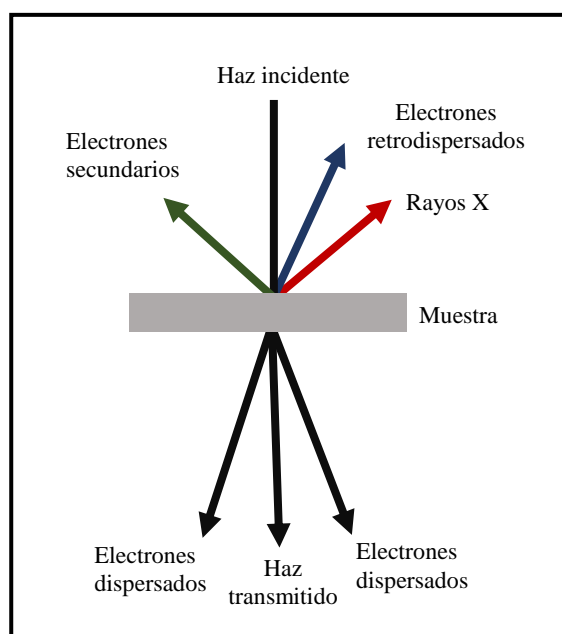


Figura 4. Dispersión del haz de electrones en el STEM.

Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados, dicho lo anterior, los electrones transmitidos con y sin dispersión se utilizan para generar una imagen con distintas intensidades de gris, revelando la estructura interna de las muestras, tamaño y distribución de partículas, su red cristalina, interfaces y defectos puntuales de la red atómica.

Los rayos X generados son utilizados para estudiar la composición química de la muestra, pudiendo analizar aisladamente zonas de muy pocas micras e incluso nanométricas. Finalmente, mediante la difracción de electrones puede hacerse un detallado estudio cristalográfico del material investigado [57].

Un microscopio electrónico de transmisión (*TEM*, por sus siglas en inglés) puede aparecer en varias formas diferentes, todas las cuales pueden ser de alta resolución, de barrido, Como resultado la imagen del TEM no solo ofrece información sobre la estructura de la muestra, si ésta es amorfa o cristalina, sino también puede brindar información cristalográfica y de composición química con la ayuda de la espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDS, por sus siglas en ingles). En la modalidad de STEM es posible hacer estudios de dispersión de partículas y mapeos químicos [58].

Para el análisis de las muestras poliméricas sensibles al haz de electrones, se utiliza un equipo que permite la observación y caracterización de materiales mediante una unidad de rastreo y transmisión (STEM) como el que se muestra en la Figura 5, obteniéndose imágenes de campo claro y campo oscuro. Este equipo dispone de un espectrómetro de energía de dispersión de Rayos X que permite la realización de análisis químicos cuantitativos y cualitativos, así como la distribución superficial simultánea de elementos químicos (hasta 32) y el análisis químico de perfil lineal [59].

Una ventaja de los instrumentos en modo STEM es que el contraste se puede mejorar recogiendo varias señales, mostrando diferencias y/o relaciones de éstas mediante procesamiento analógico o digital. En particular, los átomos individuales sobre un

sustrato delgado se pueden visualizar con un contraste mayor que un microscopio electrónico de transmisión convencional, además que nos permite realizar barridos de la muestra [60].

Para el STEM el haz de electrones se enfoca sobre la muestra y la rastrea igual que un microscopio de barrido, solo que aquí en vez de detectar los electrones secundarios se captan los electrones transmitidos.



Figura 5. Microscopio electrónico de transmisión. (JEOL) JEM-2100.

Los microscopios de transmisión tienen una capacidad de resolución muy buena entre líneas, lo que permite aplicarlo en múltiples campos de investigación: biología vegetal, nuevos materiales, medicina, farmacología, arqueología, control de calidad, investigación forense, catálisis, combustibles fósiles, energía solar, biodegradación de materiales, etc.

## Difracción de rayos X (XRD)

Los rayos X son radiación electromagnética de la misma naturaleza que la luz, pero de longitud de onda mucho más corta. Los rayos utilizados en difracción tienen longitudes de onda en el rango 0.5-2.5 Å mientras que la longitud de onda de la luz visible está en el orden de 6000 Å, lo cual se puede apreciar en el espectro [61].

La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. Esta técnica analítica se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (se mantiene la longitud de onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio [62, 63].

Como se ilustra en la Figura 6, la difracción de los rayos X por un cristal se puede describir en términos de óptica geométrica. Cuando una onda plana incidente con el vector  $\vec{K}_0$  es dispersada por los planos de la red de un cristal, los rayos paralelos difractados por los planos subsiguientes de la red tienen que viajar distancias diferentes a través del cristal. Geométricamente, la diferencia de longitud se da simplemente por  $\Delta g = 2d \sin \theta$  donde  $d$  es la distancia entre los planos y  $\theta$  es el ángulo entre la radiación incidente y los planos.

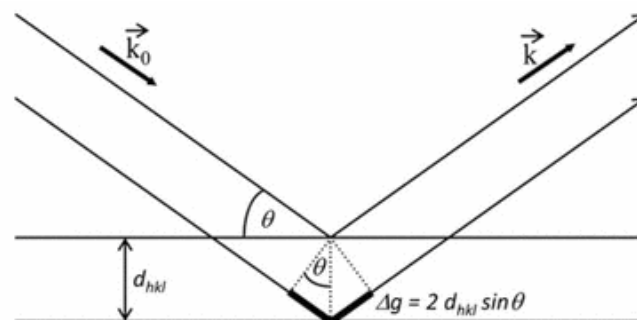


Figura 6. Ilustración para la derivación de la ecuación de Bragg [64].

Esta técnica ha llegado a ser un método indispensable para la caracterización y control de calidad de diversos materiales, considerándose una técnica no destructiva que sirve para analizar un amplio rango de materiales, tales como minerales,

polímeros, catalizadores, plásticos, compuestos farmacéuticos, cerámicos y semiconductores, entre otros. Todo experimento de este tipo requiere una fuente de rayos X, la muestra que se investiga y un detector para recoger los rayos X difractados.

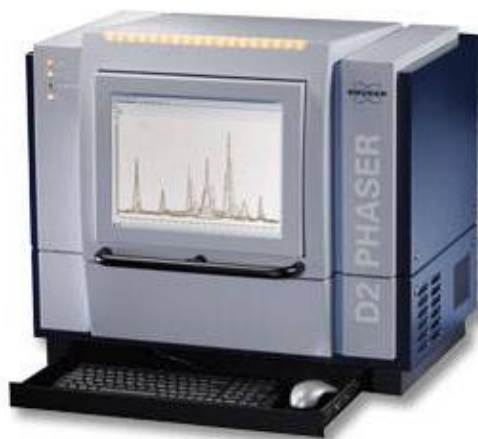


Figura 7. D2 PHASER (Bruker) equipo utilizado para la difracción de rayos X.

### **Método de Diálisis para estudio de liberación**

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el campo de la nanotecnología farmacéutica. Especialmente muchos de los estudios que se han realizado en esta área, están dirigidos a la liberación del fármaco de manera *in vitro*.

El método de diálisis dinámica ha sido extensamente utilizado para medir la cinética de liberación de fármacos encapsulados en diferentes tipos de transportadores. Por lo general, para este tipo de estudios se utiliza una membrana porosa de 12,000 Dalton (Da) (o menos) para separar la fase donante, que contiene el sistema de transporte o nanopartícula y el agente medicado de la fase de recepción, en donde se dan las condiciones de inmersión para que se lleve a cabo la liberación, utilizando una disolución de fosfatos generalmente. En esta última fase se mide la velocidad de aparición del fármaco y se toma como la tasa de liberación a partir de las nanopartículas o nanotransportadores. Recientemente, Zambito *et al.* [65] señaló que de los 90 informes de la literatura sobre la liberación del fármaco *in vitro* a partir de

nanopartículas encuestados en el año 2011, casi el 40 utiliza diálisis dinámica para medir la cinética de liberación.

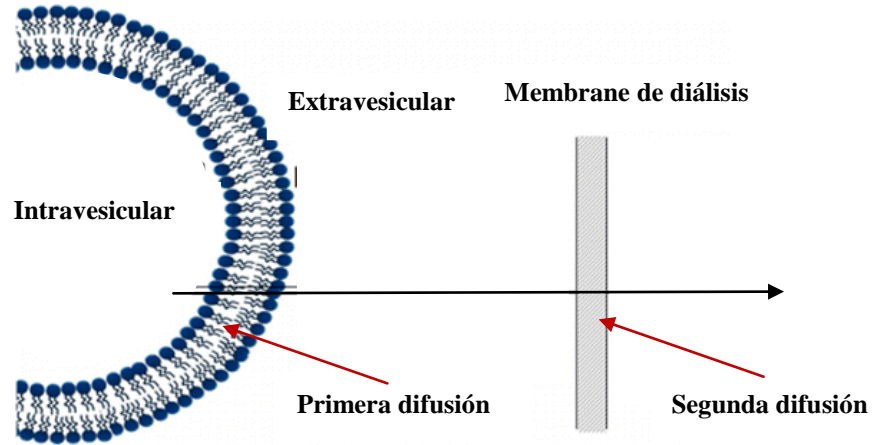


Figura 8. Esquema que representan el estudio de la cinética de liberación del fármaco desde los liposomas por el método de diálisis dinámica [66].

La mayoría de los estudios informan de un patrón de liberación que se caracteriza por una explosión de liberación de corto tiempo, seguida de una liberación sostenida de más larga duración. En la diálisis dinámica, la aparición de medicamento en el compartimiento del receptor es el resultado de la difusión de las nanopartículas seguido por difusión a través de la membrana de diálisis, aunque se trata generalmente como un simple proceso de primer orden, como se ve en la Figura 8, para un sistema liposomal [66].

## *CAPÍTULO III*

# **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

## Capítulo III. Desarrollo Experimental

### Preparación de materiales poliméricos

Los materiales utilizados para el desarrollo de este estudio adquiridos en Sigma-Aldrich fueron Polivinilpirrolidona (PVP-40000) y Polietilenglicol (PEG-8000) los cuales se utilizan para la preparación de tres muestras diferentes (P1, P2 y P3) las cuales mantienen diferentes proporciones de masa (2:1, 1:1 y 1:2 respectivamente)

La preparación de los polímeros se llevó a cabo a través de una mezcla de PEG-8000 y PVP-40000 en medio acuoso (100 ml), temperatura ambiente y agitación constante; una vez que se disolvieron completamente los polímeros, se llevaron a baño María con temperatura de 90°C hasta eliminar la mayor cantidad de agua posible, obteniéndose así un material compuesto de PEG-PVP.

### Ensayos de toxicidad de materiales poliméricos

#### *Cepa bacteriana*

La cepa de *Escherichia Coli* (*E. Coli*), empleada para realizar los bioensayos de toxicidad de los materiales poliméricos utilizados en este trabajo, es la TOP10 *E. Coli*; cultivada en medio de cultivo LB y agar EMB en una incubadora a 37° C.

#### *Medios de cultivo*

Los medios de cultivos líquidos (medios en caldo) o sólidos (medios en agar) proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

### *Caldo de luria (LB)*

Tabla 4. Composición de caldo de luria en 1 L de solución.

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
NaCl	10 g

### *Medio definido con Eosina y Azul de Metileno (EMB)*

Tabla 5. Composición de medio agar EMB en 1 L de solución.

Reactivo	Cantidad
Peptona de gelatina	10 g
Lactosa	5 g
Sacarosa	5 g
Fosfato dipotásico	2 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	65 mg
Agar	13.5 g

### *Preparación de medios de cultivo:*

1. Disolver la cantidad de medio necesario en un litro de agua destilada.
2. Mezclar con temperatura y agitación hasta que hidrate correctamente
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Para el caso del medio agar EMB, vaciarlo en cajas Petri estériles evitando la formación de burbuja

### *Bioensayo de Toxicidad*

1. Los materiales poliméricos P1, P2 y P3 se sonificaron por 5 minutos en tubos de ensayo con 5 ml de medio nutritivo (Caldo LB).

2. Se inocula una colonia de *E. Coli* de 1 mm, en los tubos que contienen los materiales poliméricos disueltos.
3. Se preparan dos tubos de control el positivo y el negativo, que contienen el caldo inoculado sin y con *E. Coli*.
4. Los tubos se incubaron a 37°C.
5. Extraer 400 µL cada 2 h y analizar en espectrofotómetro con  $\lambda=600$  nm.

### **Difracción de rayos X**

Los estudios de difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo utilizando un difractómetro de rayos X (D2-Phaser, Bruker). Las muestras seleccionadas fueron cargados en un soporte y se colocan en una placa de cuarzo para la exposición a la radiación Cu K- $\alpha$  de longitud de onda de 1.5406 Å. El difractómetro se hizo funcionar a 30 kV, 10 mA en un rango de  $2\theta$  de 10-50°, con un tamaño de paso de 0.02°, y un tiempo de recuento de 1 s/paso.

### **Carga de fármaco en el polímero**

Se pesaron 50 mg de cada muestra del material polimérico (P1, P2 y P3) y se disolvieron en 5 ml de agua destilada (concentración 10 mg/ml); simultáneamente, se pesaron 5 mg de fármaco (indometacina o 5-fluorouracilo ambos con pureza de 99%) y se disolvieron en 5 ml de etanol al 70% (concentración 1 mg/ml).

Una vez que se disolvió completamente, se mezcla la solución del material polimérico con el fármaco y se deja en agitación durante 24 h a temperatura ambiente, manteniendo una relación 1:10 del fármaco con el polímero. Posteriormente se añadieron 0.5 g de sacarosa y se dejó en agitación durante 24 h, este último actúa como un agente lioprotector. En estas etapas de agitación, el material polimérico está en contacto con el fármaco durante largos periodos de tiempo con la finalidad de lograr una mayor y adecuada encapsulación, debido a las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de los materiales. En seguida, la mezcla se congeló y se pasó a liofilizar en LABCONCO-FreeZone 2.5 durante 48 horas operando el equipo a 1.030 mBar y -49°C.

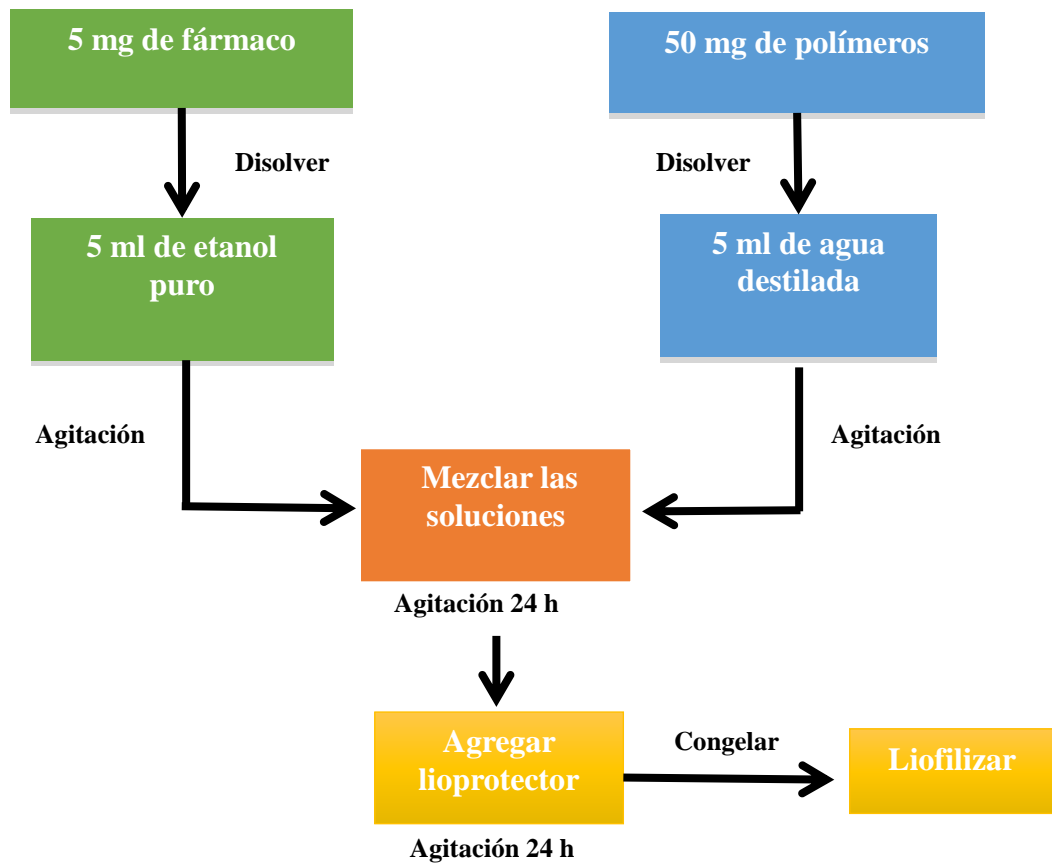


Figura 9. Diagrama del procedimiento de carga del fármaco

Como se mencionó anteriormente los materiales poliméricos (P1, P2 y P3) se cargaron con indometacina y 5-fluorouracilo en una relación de 1:10 y se identificaron como se muestran en la Tabla 6. Todos los procedimientos de carga de fármacos se realizaron por triplicado, ya que los diferentes análisis de liberación se efectuaran en el mismo número de ocasiones con la finalidad de reforzar la confianza de que se obtienen resultados confiables.

Tabla 6. Notación de los materiales poliméricos cargados con indometacina y 5-fluorouracilo respectivamente.

Notación	Composición
I1	P1 + indometacina
I2	P2 + indometacina
I3	P3 + indometacina
F1	P1 + 5-fluorouracilo
F2	P2 + 5-fluorouracilo
F3	P3 + 5-fluorouracilo

### **Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido**

La Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido (STEM, *por sus siglas en inglés*) es una técnica utilizada para estudiar la forma, la estructura y el tamaño de los polímeros, ya que es capaz de concentrar el haz de electrones en un punto estrecho y escanear la muestra, evitando o reduciendo el daño a los materiales poliméricos utilizados para encapsular ambos fármacos hidrofóbicos. Para su análisis P1, P2, P3, I1, I2, I3, F1, F2 y F3 son dispersadas en alcohol isopropílico mediante ultrasonidos; inmediatamente se coloca un poco de la suspensión en una rejilla de cobre revestida con una película de carbono, para secar en condiciones ambientales y luego examinar bajo el Microscopio Electrónico de Transmisión.

Las micrografías se obtuvieron utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión. (JEOL) JEM-2100 que funciona a 200 kV de voltaje de aceleración con un filamento LaB<sub>6</sub> en modo STEM con detector de campo claro.

### **Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)**

Los espectros FT-IR se obtuvieron manipulando un espectrofotómetro infrarrojo Spectrum Two (Perkin Elmer) con detector directo en modo de transmitancia y resolución de 0.5 cm<sup>-1</sup>. Las muestras se pusieron en contacto con reflectancia total atenuada horizontal (ATR, por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente (20 °C) y los espectros se consiguieron usando Spectrum en la versión 6.0 del software Lab.

Antes y después de cada lectura se tomó de referencia un nuevo espectro de fondo del aire. Las mediciones se realizaron en modo transmitancia para cada una de las muestras de PEG-8000, PVP-40000, P1, P2, P3, I1, I2, I3, F1, F2, F3, 5-fluorouracilo e indometacina pura.

### **Estudios de la liberación de fármacos**

Para las pruebas de liberación de fármaco se utilizaron membranas de diálisis (4-MWCO con un peso molecular de corte de 12.000-14.000 Da) marca Spectra/Por y se preparó una solución salina amortiguadora de fosfatos (*PBS, por sus siglas en inglés phosphate buffered saline*) con un pH de 7.2. La solución PBS 10X se diluye a 1X para utilizarse como medio en las pruebas de liberación del fármaco.

Tabla 7. Composición de solución PBS (solución stock 10X).

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio (NaCl)	20.15 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.55g
Fosfato de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.875g
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.5g

Para las pruebas de liberación *in-vitro* de los fármacos, se disuelven completamente los materiales poliméricos cargados con fármaco (I1, I2, I3, F1, F2 y F3) en 10 ml de PBS y se inyectan en las membranas de diálisis, posteriormente estas membranas completamente cerrados (en forma de tubo) se colocan dentro de un vaso de precipitado con 100 ml de solución PBS, que funciona como medio de liberación, como se muestra en la Figura 10.

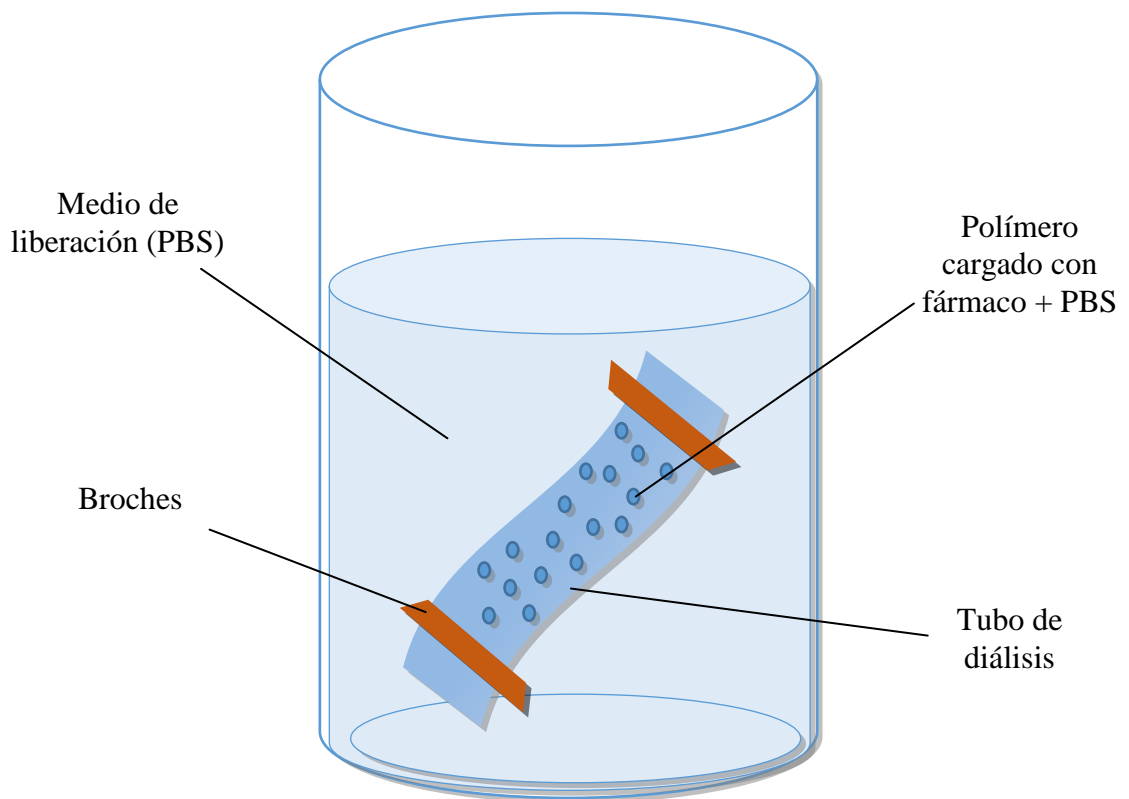


Figura 10. Representación gráfica del sistema de liberación controlada de fármacos.

El fenómeno de difusión para la liberación de indometacina y 5-fluorouracilo a través de la membrana se realizó en una incubadora a 100 rpm, pH = 7.2 y una temperatura de 36 ° C simulando las condiciones de la piel. El muestreo se llevó a cabo tomando 2 ml del líquido circundante a la membrana presente en el vaso de precipitado, dichas muestras fueron analizadas mediante espectrometría UV-vis (HACH-DR 5000) con la longitud de onda correspondiente a cada fármaco.

### **Curvas de calibración**

Para elaborar las curvas de calibración de los fármacos se prepararon las disoluciones patrón en una solución de PBS para el 5-fluorouracilo y en etanol al 70% para la indometacina, respectivamente. Se midieron en el UV-vis con la finalidad de obtener la función señal–concentración y poder construir la curva de calibración para diferentes concentraciones conocidas que estén dentro del rango válido, sin sobrepasar el límite de linealidad, marcando la concentración máxima para la cual la curva de calibración sería fiable. Una vez realizada la curva de calibración se utilizó para elucidar la concentración de los fármacos en el estudio de liberación.

CAPÍTULO IV

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## Capítulo IV. Resultados y Discusión

### Preparación de materiales poliméricos:

Como se describe con anterioridad, para llevar a cabo este estudio los materiales poliméricos se preparan en diferentes proporciones de masa a partir de PEG-8000 y PVP-40000, obteniéndose así tres muestras diferentes como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Relaciones de masa de los materiales poliméricos (P1, P2 y P3).

Muestra / Polímero	P1	P2	P3
PVP-40000	2.0004 g	1.0040 g	1.0009
PEG-8000	1.0007 g	1.0045 g	2.0003
Relación másica	2:1	1:1	1:2

De origen el PEG es un material blanco y granulado, que al disolverse se vuelve incoloro; al igual que el PEG, el PVP es un polvo fino, color blanco que en solución es transparente. Al mezclarse estos dos compuesto y conforme se elimina el agua en la mezcla, las muestras presentaron un tono amarillo claro, obteniéndose así un material polimérico a base de PEG-PVP, como los que se muestran en la Figura 11.

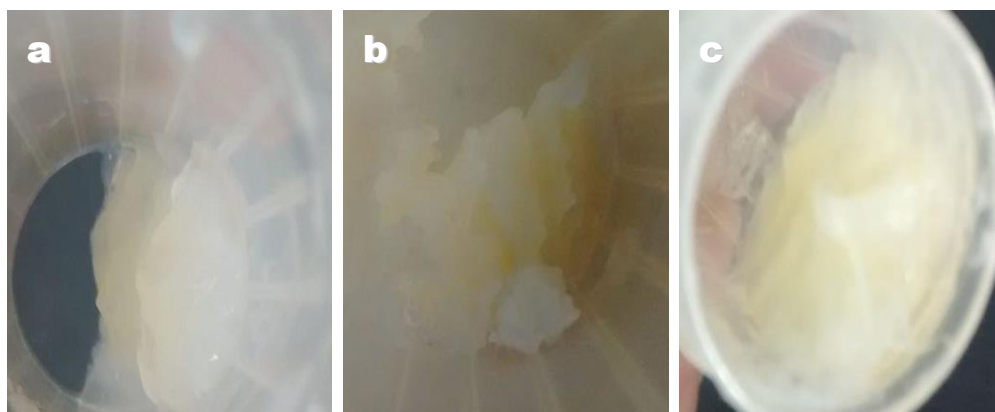


Figura 11. Materiales poliméricos compuestos de PEG: PVP con diferente relación de masa: (a) P1, (b) P2 y (c) P3.

## Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos de toxicidad se analizan observando el comportamiento de la curva de crecimiento de una cepa bacteriana. En este caso, se utilizó una cepa de *Escherichia coli* (*E. Coli*) para reconocer y evaluar los efectos tóxicos de los materiales poliméricos de PEG-PVP.

En la Figura 12 se puede observar que P1, P2 y P3 presentan alto índice de viabilidad y un crecimiento similar al control positivo, mostrándose compatibles biológicamente con la cepa de *E. Coli*. Por lo tanto, los materiales a base de PEG y PVP no presentaron toxicidad hacia la bacteria y se muestran como buenos candidatos para aplicaciones en el transporte de fármacos.

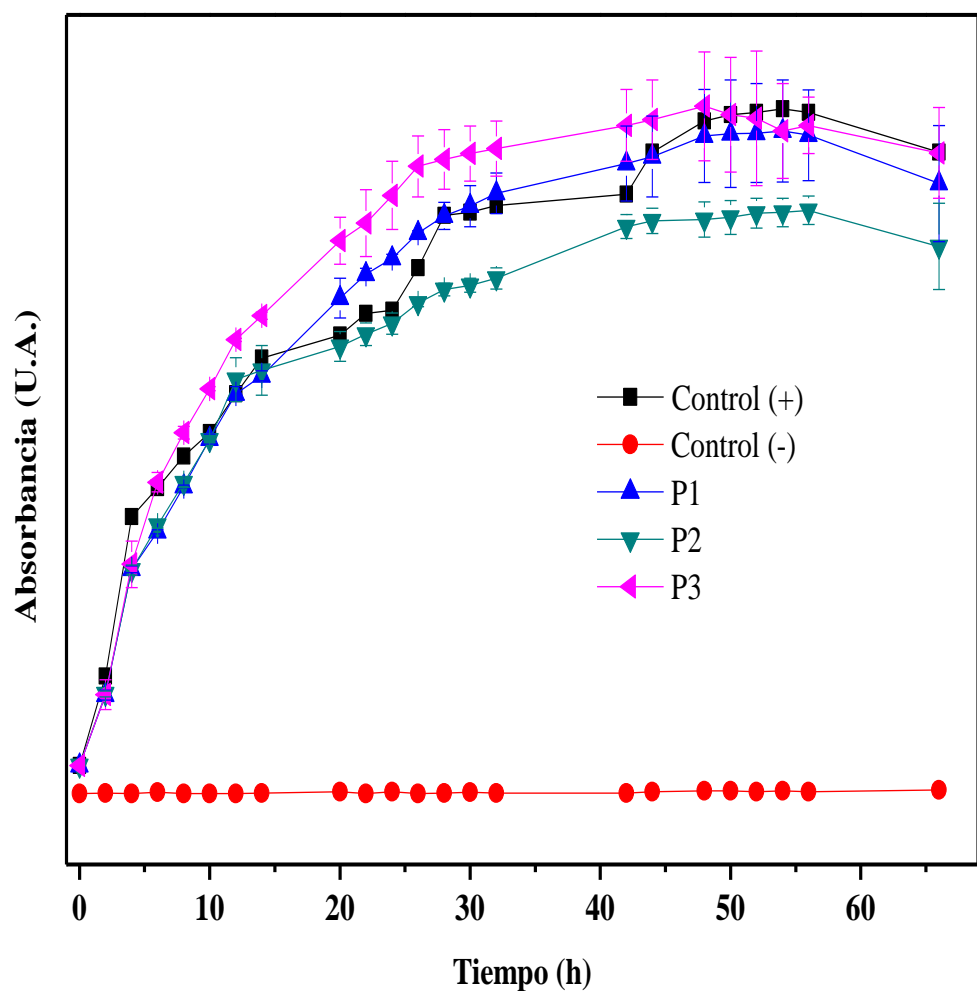


Figura 12. Curvas de crecimiento de *E. Coli* en presencia de materiales poliméricos PEG-PVP (P1, P2 y P3).

## Difracción de rayos X

Las propiedades mecánicas de los polímeros pueden ser alteradas por el grado de cristalinidad, debido a la disposición uniforme de sus cadenas dentro de su estructura, por ejemplo, un polímero cristalino se degradará más lentamente que uno amorfo. Sin embargo, los polímeros cristalinos son frágiles y por lo general menos adecuados para la aplicación de administración de fármacos [67].

En la Figura 13, de acuerdo con los patrones de difracción de las muestras P1, P2 y P3 muestran una intensidad en el ángulo de difracción  $2\theta$  de 21.12 y 24.34, los cuales corresponden al PEG, mientras que PVP es totalmente amorfo, este no presenta ninguna intensidad en los difractogramas [68]. Por eso la combinación de las propiedades de ambos materiales ayudan a lograr una adecuada liberación de los fármacos cristalinos y poco solubles. Por estas razones en este trabajo se decidió utilizar un polímero cristalino y uno amorfo, con la finalidad de combinar sus propiedades.

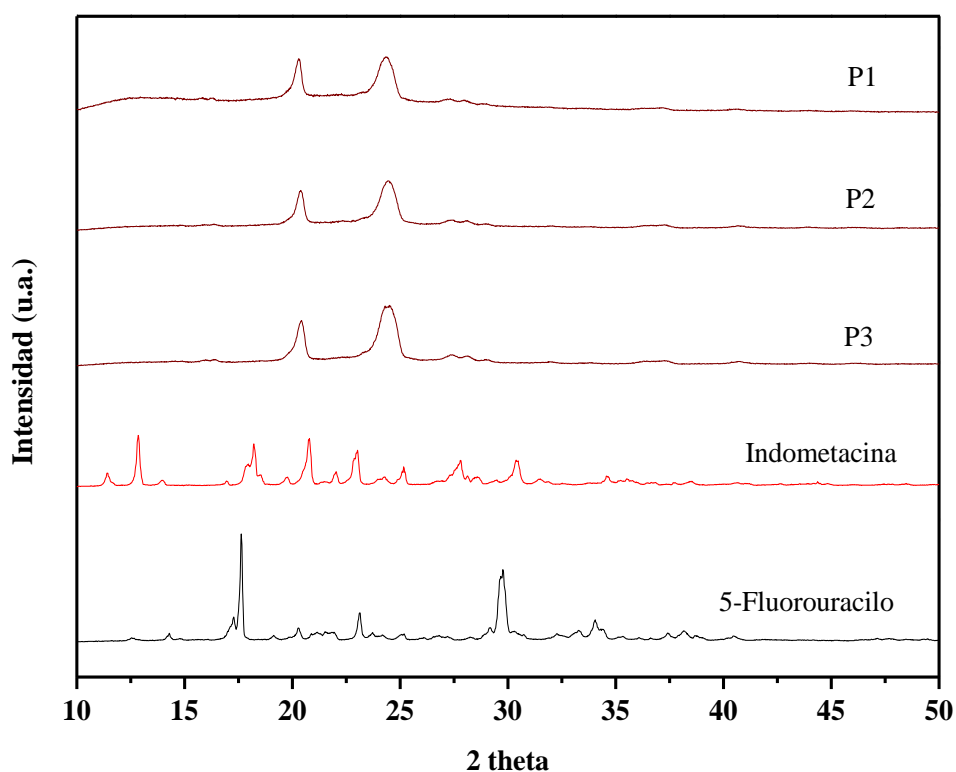


Figura 13. XRD de indometacina, 5-fluorouracilo, P1, P2 y P3.

## Carga del fármaco en el polímero

Uno de los requisitos básicos para los tratamientos es la dosis de fármaco encapsulada, para el estudio de las liberaciones por medio de la técnica de UV-vis, se procede a cargar las muestras en una relación 1:10, encapsulando la mayor cantidad de fármaco posible en el sistema polimérico sin que esta pierda su estructura micelar. En la Figura 14 se muestran las diferentes muestras de polímeros cargados con indometacina y 5-fluorouracilo después de liofilizar.

Las micelas sintetizadas fueron liofilizadas con sacarosa como lioprotector, mostrándose la sacarosa como un buen candidato de acuerdo con los estudios de Tobias Miller *et al.* [69] donde establece que los procedimientos de carga como la estabilización con el lioprotector son de relevancia para el desarrollo de nuevas técnicas de preparación de micelas poliméricas cargadas, debido a que este puede actuar como un protector versátil para las micelas poliméricas frágiles.

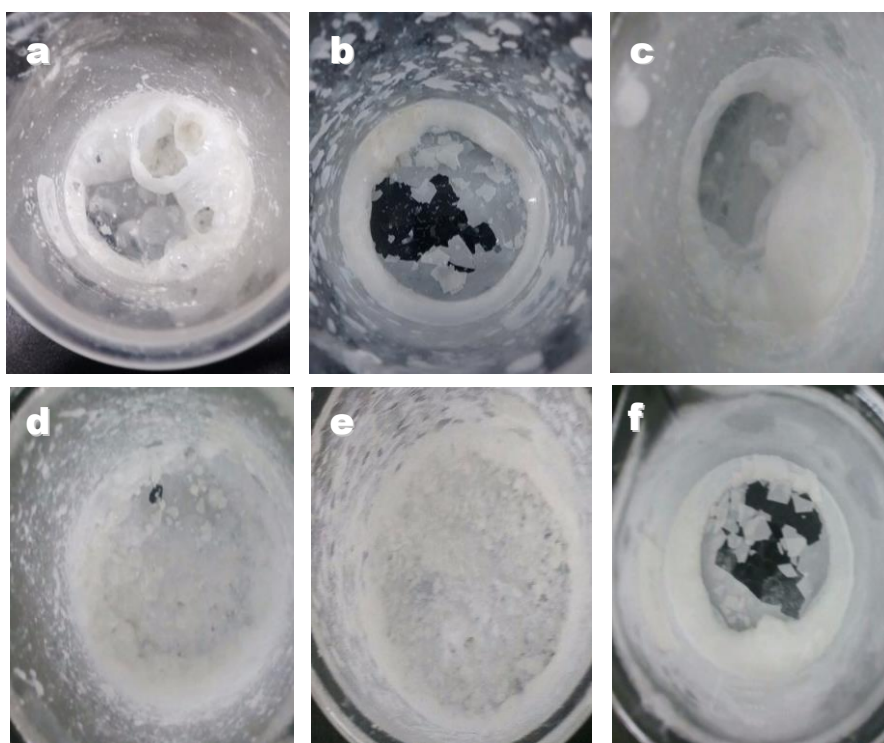


Figura 14. Materiales poliméricos cargados con indometacina (a) I1, (b) I2 y (c) I3; con 5-fluorouracilo (d) F1, (e) F2 y (f) F3 después de liofilizar.

## **Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)**

### **Materiales poliméricos**

La Figura 15 muestra el espectro FT-IR del material polimérico PEG-PVP a sus diferentes relaciones de masa (P1, P2 y P3). Los análisis se realizaron en una frecuencia de  $750\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  a temperatura ambiente. El espectro claramente exhibe bandas características de PEG y PVP.

Los resultados muestran las señales características de la cadena de polietilenglicol siendo a  $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$  las señales características de las vibraciones de  $\text{-C-O-C-}$  y en  $945\text{-}1106\text{ cm}^{-1}$  los de  $\text{-C-O-}$ , también se observaron las bandas características de polivinilpirrolidona para los enlaces  $\text{C=O}$  en  $1698\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C=C}$  a  $1631\text{ cm}^{-1}$  y la señal característica de  $\text{C-N}$  a  $1.278\text{ cm}^{-1}$ , además, se apreciaron los distintos enlaces  $\text{C-H}$  de  $1300\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$  y  $2850\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$  de PEG y PVP respectivamente. A mayor concentración de PVP los picos de absorción de  $\text{C=O}$  característicos a  $1698\text{ cm}^{-1}$  se hacen más evidentes. Además, a medida que aumenta el contenido de PEG en los materiales poliméricos las bandas características de absorción de  $\text{C-O-C}$  se hacen más notorias [70].

### **Polímeros cargados con indometacina**

Se realizaron las pruebas de FT-IR para corroborar de alguna forma la presencia de indometacina en los materiales poliméricos.

En la Figura 16 se aprecian las bandas características de la indometacina en  $3025\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento  $\text{C-H}$  aromático),  $2967\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión  $\text{C-H}$ ),  $1712\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión  $\text{C=O}$ ),  $1690\text{ cm}^{-1}$  (grupo amida), en  $1261\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento  $\text{O-C}$  asimétrica aromático) y  $1.086\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento  $\text{O-H}$  simétrica aromático) lo que confirma que el fármaco está presente en el sistema micelar [71, 72, 73]. También es posible observar las señales características de los materiales poliméricos analizados con anterioridad.

## Polímeros cargados con 5-fluorouracilo

La interacción y unión de 5-fluorouracilo a los materiales poliméricos se confirmaron mediante los espectros FT-IR de 5-fluorouracilo y los materiales poliméricos cargados con dicho fármaco (F1, F2 y F3). La Figura 17 muestra los espectros FT-IR de 5-fluorouracilo puro y sus interacciones con F1, F2 y F3 que corresponden a los encapsulados; todo esto en la región de 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro FTIR de 5-FU mostró picos característicos a 3125  $\text{cm}^{-1}$  para el estiramiento N-H, 1726  $\text{cm}^{-1}$  para estiramiento C=O y 1662  $\text{cm}^{-1}$  y 1247  $\text{cm}^{-1}$  para vibración en el anillo [74].

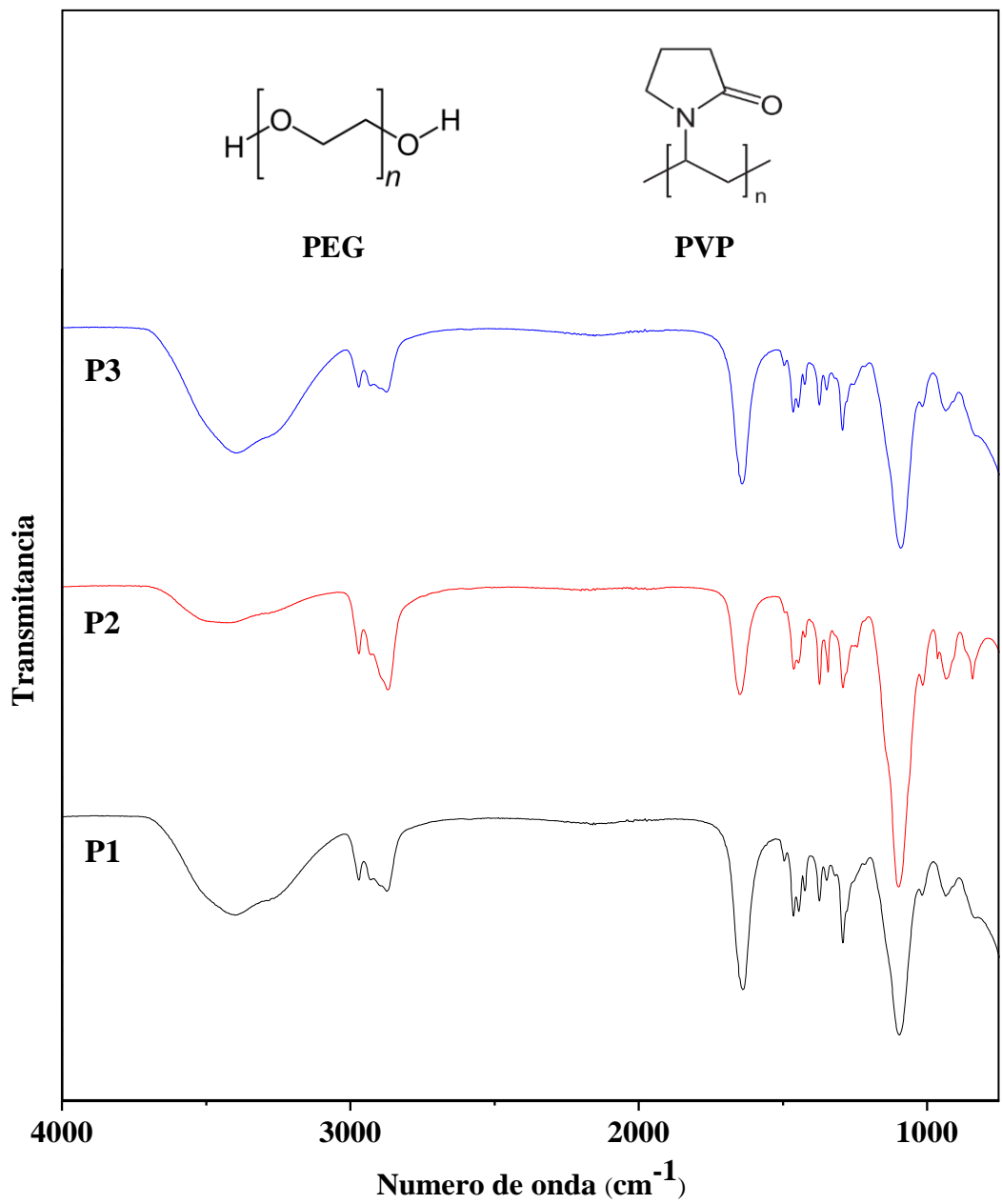


Figura 15. (a) FT-IR de los materiales poliméricos P1, P2 y P3.

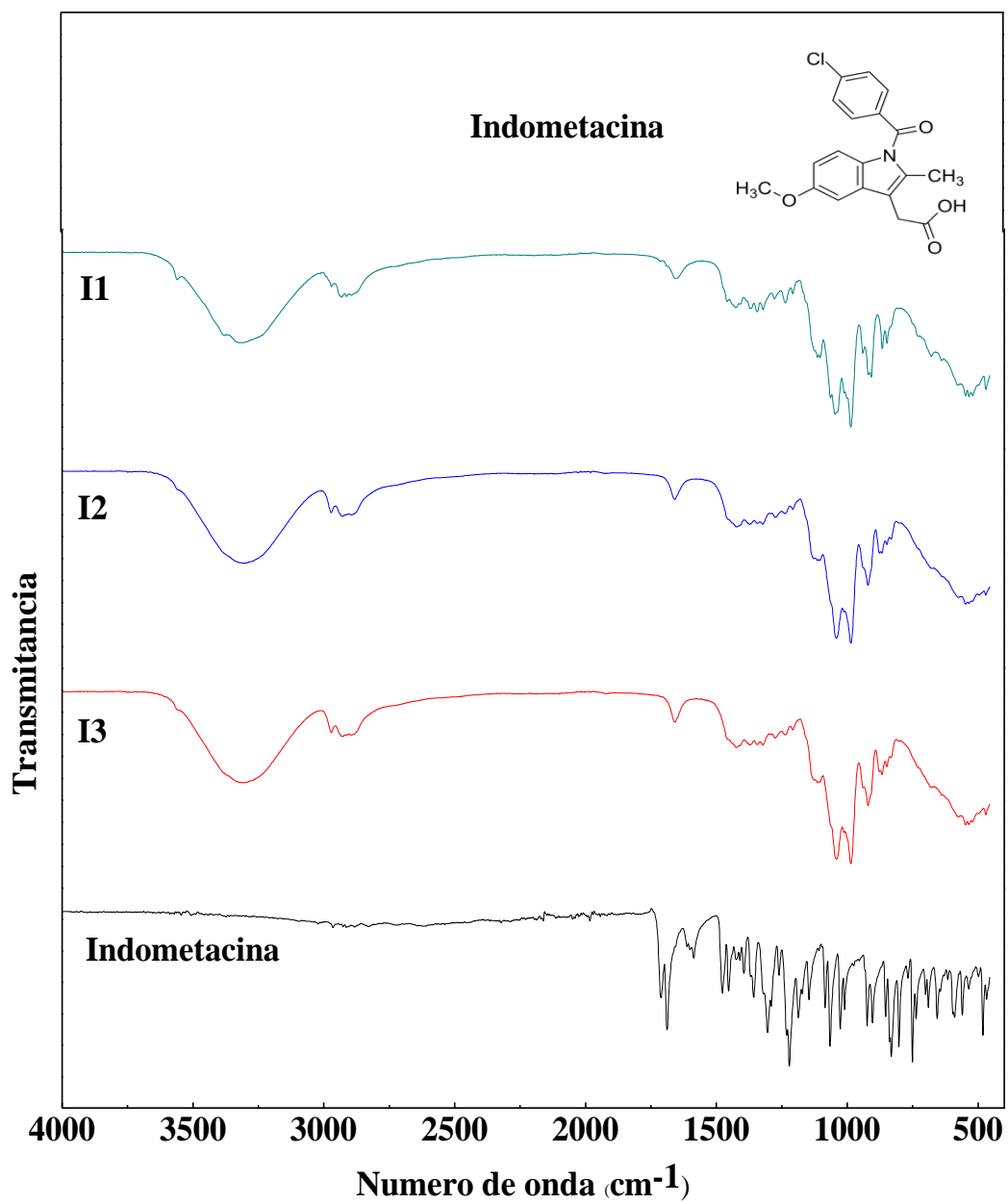


Figura 16. (a) FT-IR de los materiales poliméricos cargados con indometacina I1, I2 e I3 después de liofilizar y de indometacina pura.

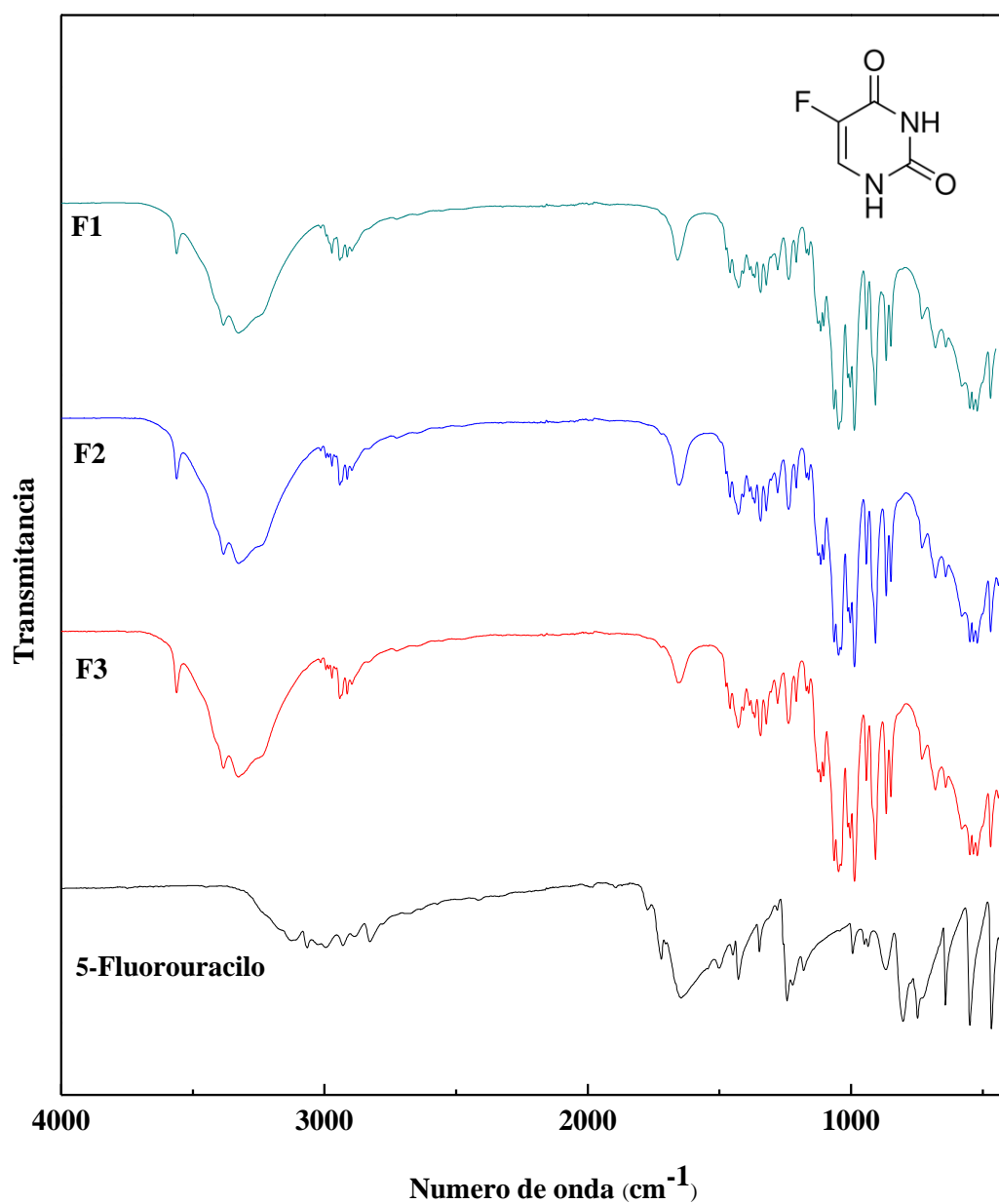


Figura 17. (a) FT-IR Materiales poliméricos cargados con 5-fluorouracilo F1, F2 y F3 después de liofilizar y de 5-fluorouracilo puro.

## **Microscopía Electrónica de Transmisión- Barrido (STEM)**

El estudio de la morfología de los materiales se realizó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido (STEM) utilizando el detector de campo claro. A continuación, se aprecian las micrografías de los materiales poliméricos sin la presencia del fármaco (P1, P2 y P3), la de los materiales poliméricos cargados con indometacina (I1, I2 e I3) y los materiales cargados con 5-fluorouracilo (F1, F2 y F3)

En la Figura 18 se muestran los materiales poliméricos sin la presencia de los fármacos, siendo (a) P1, (b) P2 y (c) P3 a diferentes relaciones másicas respectivamente. En la Figura 18(a) se muestra P1 que corresponde a una relación 1:2 de PEG: PVP y sostiene una distribución de tamaño de  $0.1 \mu\text{m}$  de diámetro, presentando en su mayoría formas circulares, siendo la más pequeña de las muestras sin cargar. La Figura 18(b) muestra la micrografía de P2 el cual mantiene una relación 1:1, y nos deja ver tamaños que oscilan entre  $0.2 \mu\text{m}$  y  $0.5 \mu\text{m}$  con una forma semicircular, no muy definida. La Figura 18(c) muestra formas irregulares e indefinidas y corresponde a la muestra P3 compuesta de PEG-PVP con una relación 2:1 de PEG-PVP.

En la Figura 21 se muestran los materiales poliméricos cargados con indometacina, siendo (a) I1, (b) I2 y (c) I3. Primeramente, en la Figura 19(a) se muestra el sistema I1 sin mostrar micelas perfectamente definidas, además, de diferentes tamaños y ligeras aglomeraciones de sus componentes. Para la Figura 19(b), el sistema polimérico cargado con indometacina I2 tiene una forma circular definida con tamaños regulares con una distribución de  $1 \mu\text{m}$ , y tamaños que van de  $0.5 \mu\text{m}$  a  $1.5 \mu\text{m}$ , estos materiales no muestran aglomeraciones y mantienen buena estructura, apreciándose perfectamente el núcleo hidrofóbico y la corona hidrofílica de los materiales. La Figura 19(c) nos enseña la micrografía de la muestra I3, donde se observan sistemas micelares circulares bien definidos, pero de menor tamaño que I2, con diámetros de aproximadamente de  $0.4 \mu\text{m}$ .

En la Figura 20 se muestran los materiales cargados con 5-fluorouracilo, siendo (a) F1, (b) F2 y (c) F3. En estas micrografías se puede apreciar que la relación en masa utilizada para los materiales poliméricos juega un papel importante en la

encapsulación de los fármacos, mostrando comportamientos similares a los mostrados en la Figura 19. Para este caso en la Figura 20(a) se aprecia el sistema F1 con diferentes tamaños que van desde 0.1 a 1  $\mu\text{m}$ , observándose formas circulares, con núcleos ligeramente cargados, en términos generales muestra mayor inestabilidad para la encapsulación de 5-fluorouracilo que los sistemas F2 y F3. Para la Figura 20(b), el sistema F2 tiene una forma circular definida con tamaños regulares, manteniendo una distribución de 1.2  $\mu\text{m}$ , y tamaños que van de 0.8  $\mu\text{m}$  a 1.3  $\mu\text{m}$ , estos materiales no muestran aglomeraciones y mantienen una clara estructura micelar. La Figura 20(c) nos enseña la micrografía de la muestra F3, donde se observan sistemas micelares circulares bien definidos, de tamaño similar a F2, con diámetros aproximados de 1  $\mu\text{m}$ , aun así, muestra una distribución de tamaño más pequeña que F2.

Para las figuras 18, 19 y 20 se muestra claramente el cambio existente entre un sistema cargado con el fármaco y los sistemas de los materiales poliméricos sin cargar, debido a que una vez cargados muestran estructuras circulares y arquitecturas definidas en su mayoría.

Los sistemas cargados con fármacos exhiben claramente un núcleo con tonalidad opaca (oscura) que concierne a la parte hidrofóbica del sistema micelar, en este caso compuesta de indometacina o 5-fluorouracilo, mientras que la parte hidrofílica que actúa como un sistema de almacenamiento y dosificación, está formada por el material polimérico PEG:PVP con diferentes relaciones de masa, presente alrededor del núcleo hidrofóbico como se aprecia claramente en la Figura 21, que corresponden a diferentes micrografías de I2 y F2, respectivamente. También es importante mencionar que el fenómeno de difusión, la morfología y el tamaño de los sistemas poliméricos pueden llegar a jugar un papel importante en la liberación de los fármacos a través del sistema polimérico micelar [75].

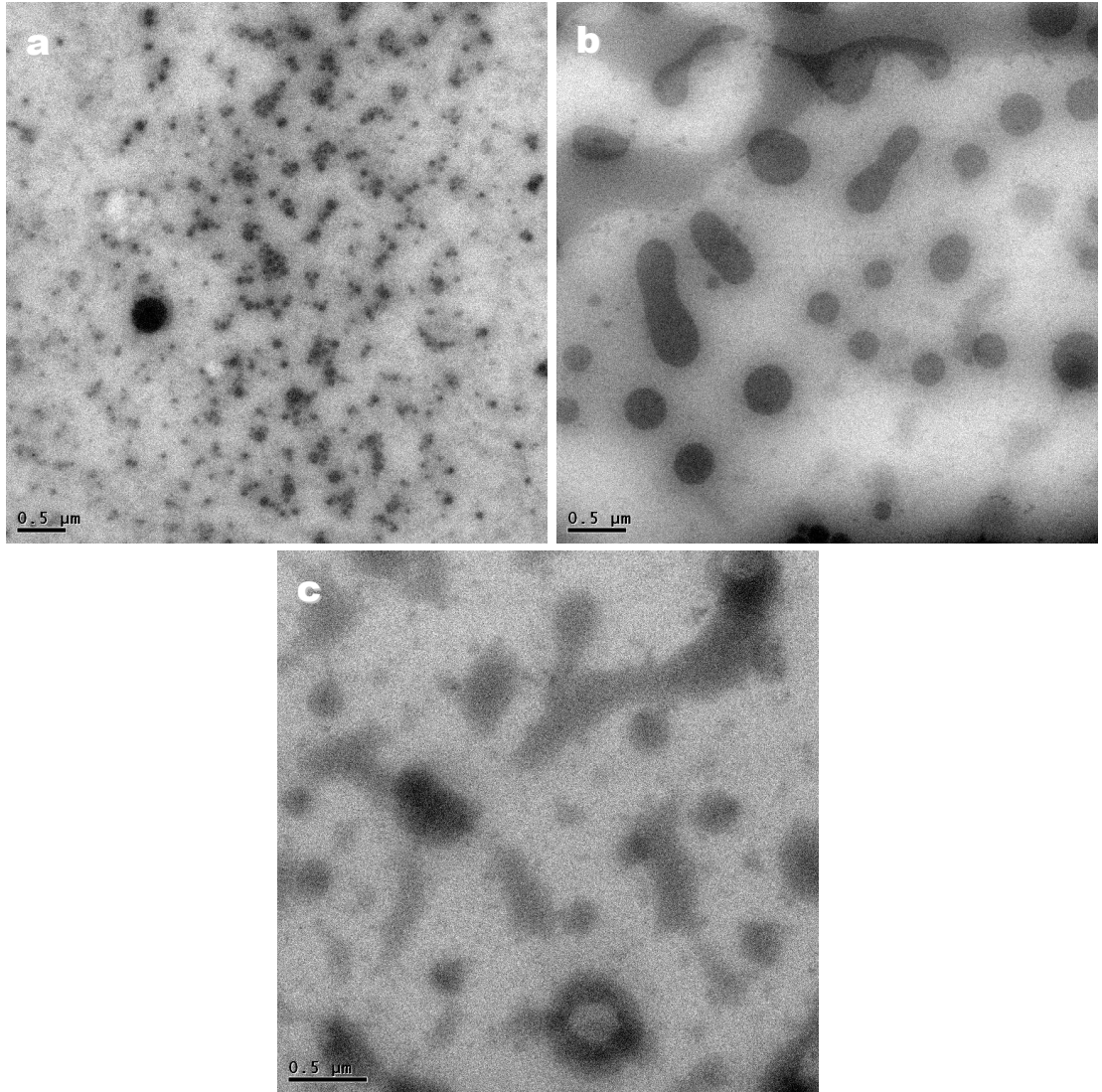


Figura 18. Micrografías STEM de materiales poliméricos (a) P1, (b) P2 y (c) P3.

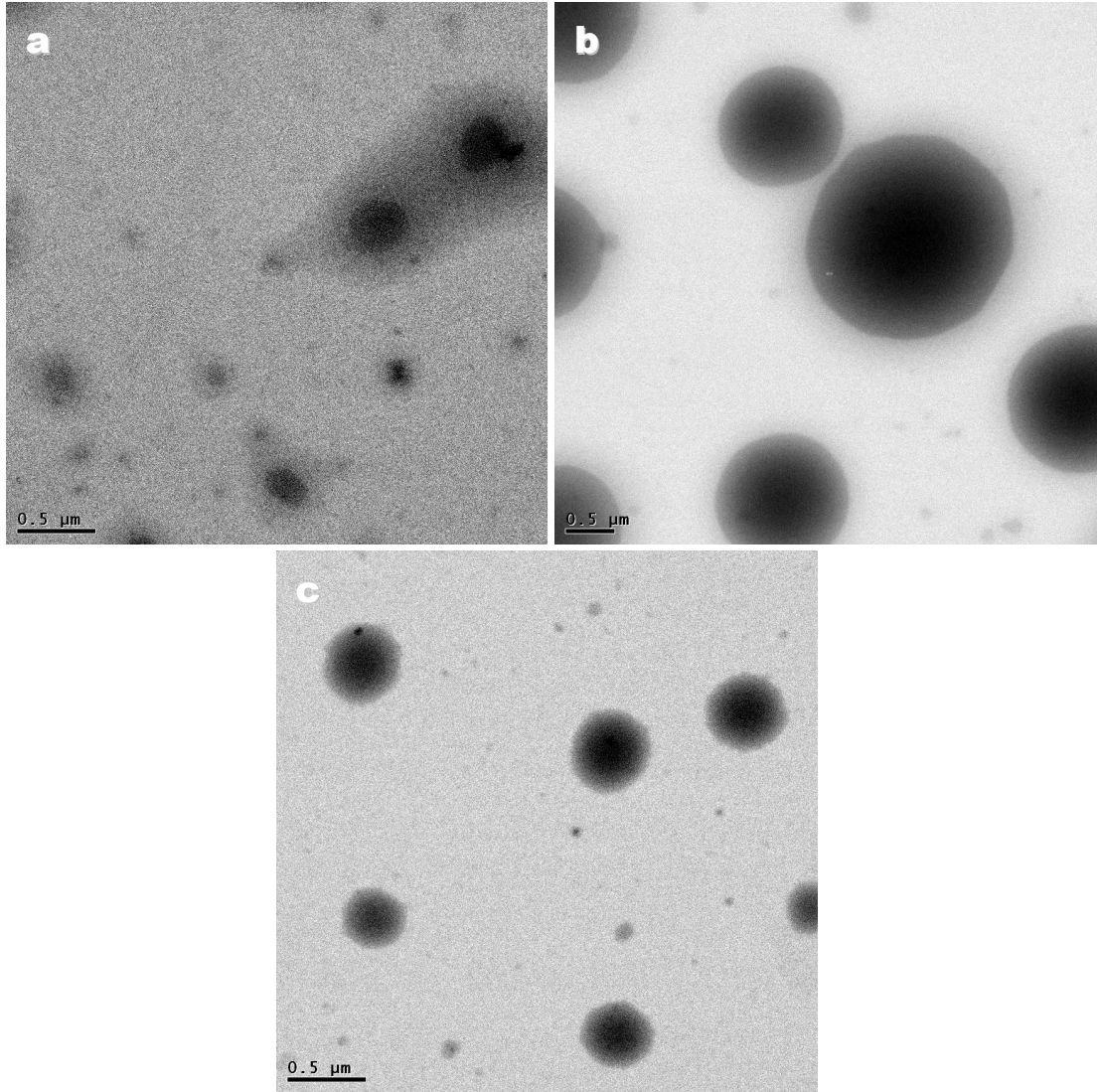


Figura 19. Micrografías STEM de materiales poliméricos cargados con indometacina  
(a) I1, (b) I2 y (c) I3.

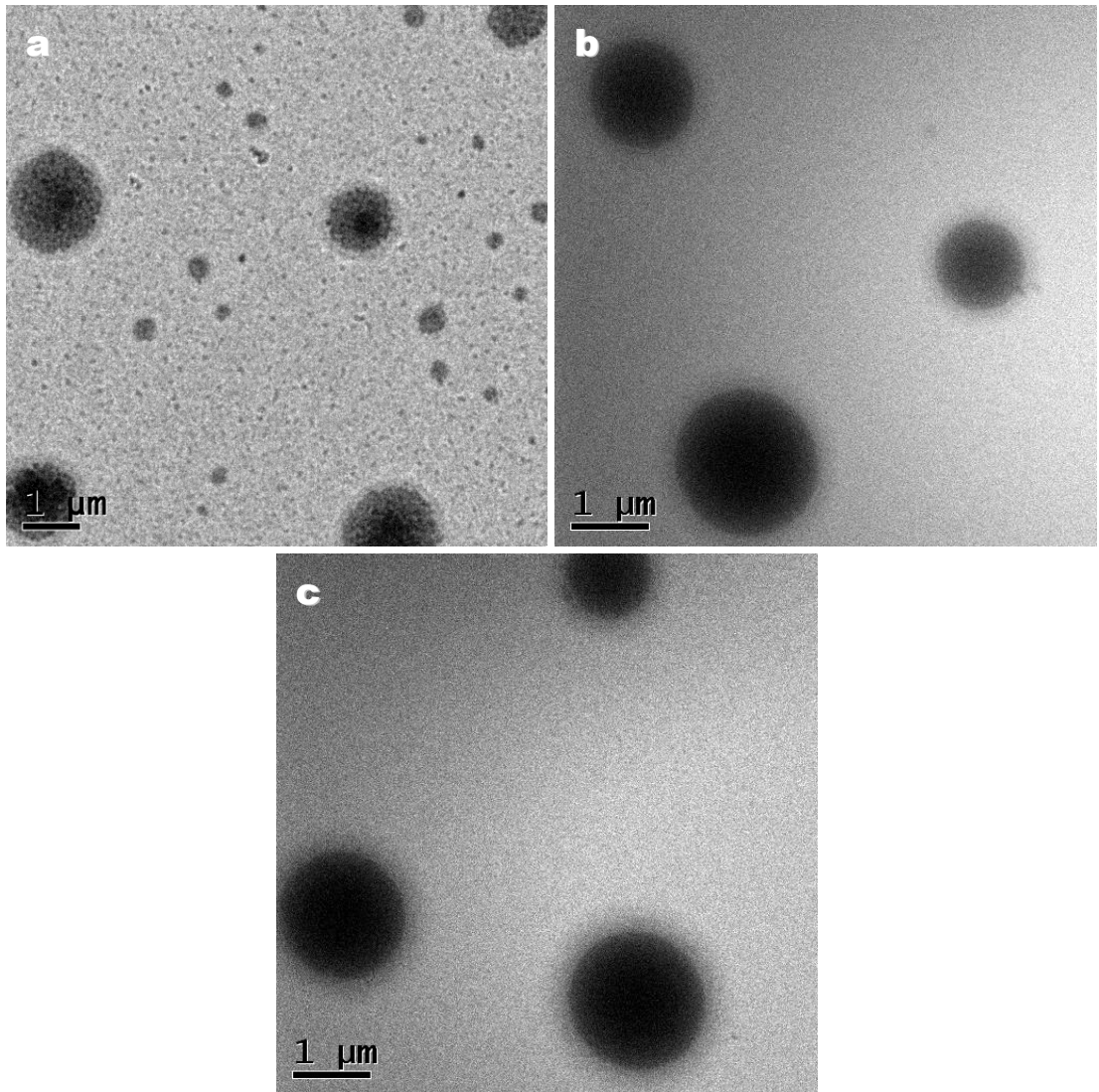


Figura 20. Micrografías STEM de materiales poliméricos cargados con 5-fluorouracilo (a) F1, (b) F2 y (c) F3.

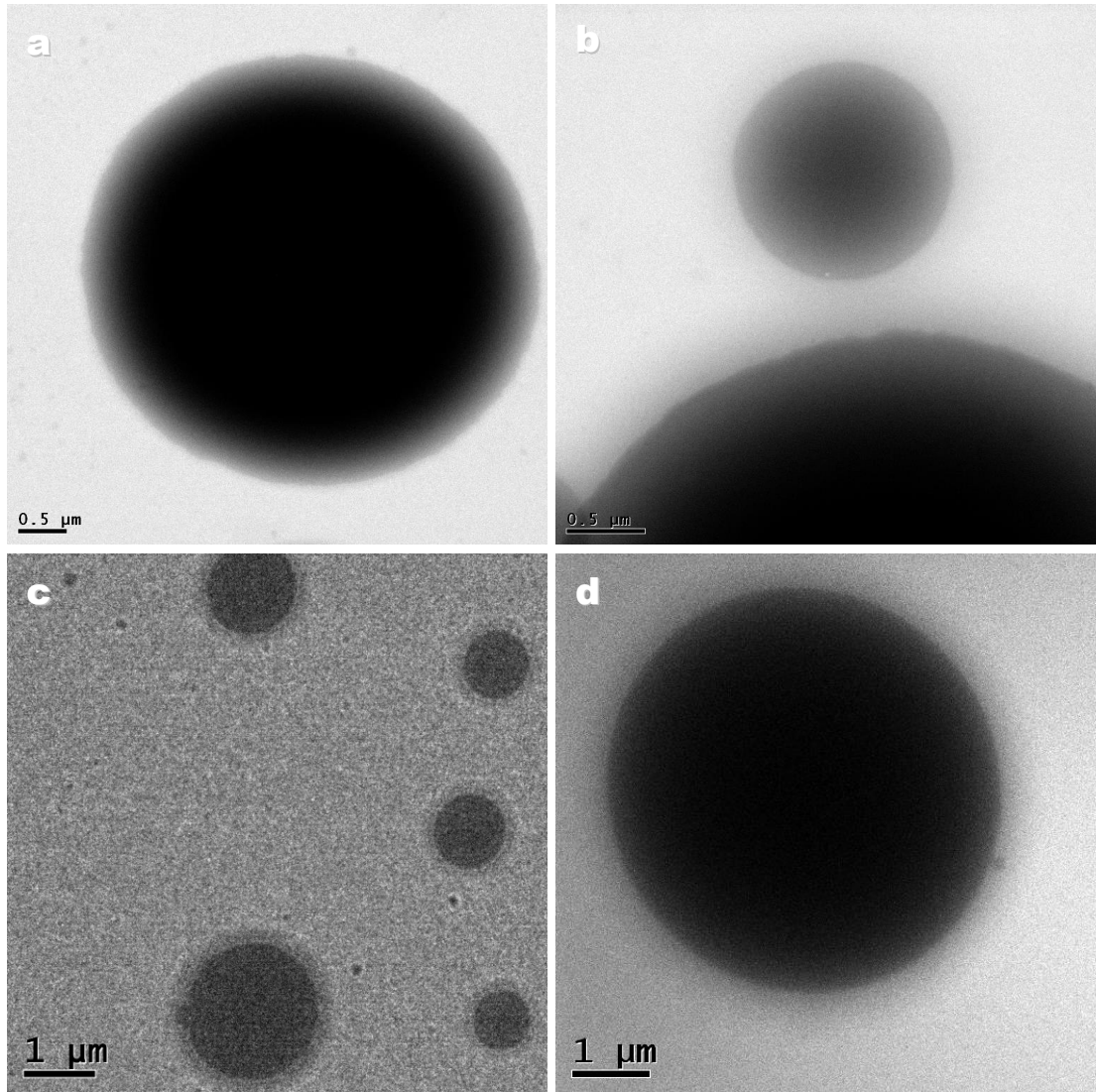


Figura 21. Micrografías de STEM del material cargado con indometacina (a) y (b) que conciernen a la muestra I2; mientras que (c) y (d) corresponden a la muestra F2 de 5-fluorouracilo cargada en el material polimérico.

## Estudios de liberación controlada de fármacos

### *Determinación de longitud de onda*

Antes de comenzar con las pruebas de liberación de indometacina y 5-fluorouracilo, se determinó la longitud de onda correspondiente al pico máximo de absorción de todos los compuestos utilizados en el procedimiento de encapsulación, con el fin de verificar que no exista interferencia para la cuantificación de la concentración liberada de indometacina y 5-fluorouracilo.

Para la determinación del pico máximo de absorción de cada uno de los materiales utilizados en la fabricación del sistema micelar, se llevaron a cabo diferentes mediciones de las diluciones de estos compuestos a diferentes longitudes de onda, realizándose barridos de los 190 a los 1000 nm. En la Tabla 9 se muestra el punto máximo de absorción para cada compuesto.

Tabla 9. Longitud de onda máxima de los materiales involucrados en los estudios de liberación de fármaco.

Compuesto	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)
PEG	207
PVP	233
P1	233
P2	231
P3	229
Lioprotector	218
Indometacina	267
5-fluoracilo	266

De lo anterior se puede observar que la indometacina y el 5-fluorouracilo presentaron una absorbancia de 267 y 266 nm respectivamente, mientras que los otros materiales tienen una longitud de onda máxima que no interfiere con la de los fármacos. Por lo tanto, estas longitudes de onda fueron seleccionadas para realizar los experimentos de liberación de cada uno de los fármacos.

### *Curvas de calibración*

La curva de calibración es un método analítico muy utilizado para determinar la concentración de una sustancia en una muestra desconocida. Para su construcción se utilizan disoluciones que contienen concentraciones conocidas de analito. En este caso, las curvas de calibración se realizaron para conocer la concentración de fármaco liberado, utilizando cinco puntos de referencia, los cuales se encuentran entre los intervalos de concentración que se pudieron presentar en los fenómenos de liberación.

#### *Curva calibración indometacina*

Aquí se muestran los resultados de la curva de calibración de indometacina disuelta en una solución de etanol al 70%. Estas curvas de calibración se midieron a una longitud de onda de 267 nm, la cual corresponde a una de las señales más intensas, características de la indometacina. En la Tabla 10 se dan a conocer las concentraciones (peso/volumen) utilizadas para la elaboración de las curvas de calibración y los valores de absorbancia correspondientes a cada disolución.

Tabla 10. Valores de absorbancia de indometacina en el punto máximo de absorción por UV-VIS.

<b>Concentración</b> mg Indometacina / 100 ml solvente	<b>Absorbancia</b>
0	0
1	0.584
2	1.135
3	1.355
4	1.856
5	2.200

La ecuación de la recta que nos permite calcular las concentraciones de fármaco liberado por las micelas poliméricas; se obtiene al graficar el valor de absorbancia de

cada disolución. Para este caso la ecuación de la recta es  $42.96X + 0.1143$ , con un valor de  $r^2 = 0.9818$ , como se muestra en la Figura 22.

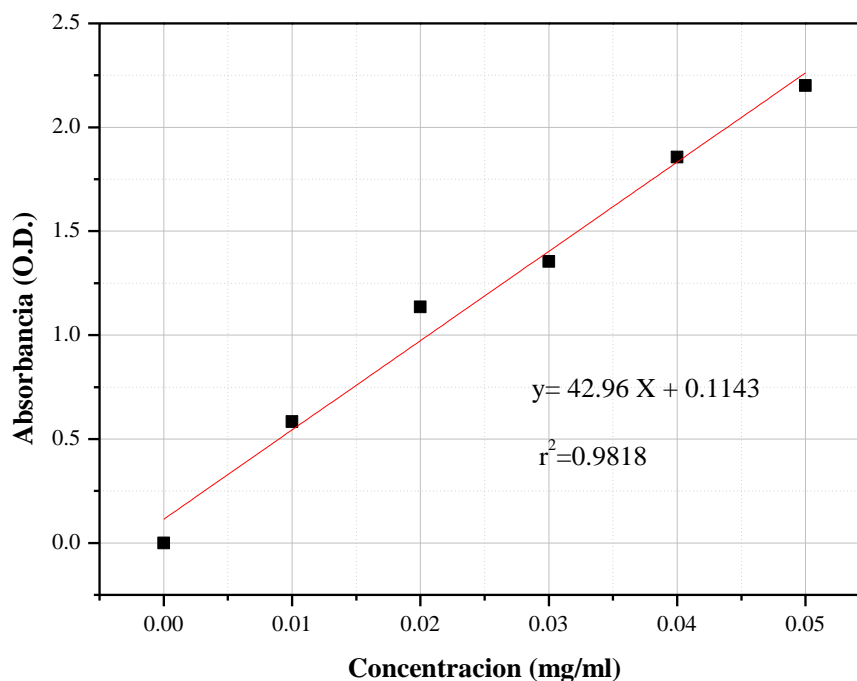


Figura 22. Curva de calibración de indometacina.

#### *Curva de calibración de 5-fluorouracilo*

Se realizó el mismo procedimiento para las curvas de calibración del 5-fluorouracilo, disolviéndolo en una solución de fosfatos a pH de 7.2. Las lecturas de absorbancia fueron obtenidas a una longitud de onda de 266 nm característico del 5-fluorouracilo. En la Tabla 11 se presentan las concentraciones (peso/volumen) utilizadas para las curvas de calibración y los valores de absorbancia correspondientes a cada disolución.

Tabla 11. Valores de absorbancia del 5-fluorouracilo en el punto máximo de absorción por UV-VIS.

<b>Concentración</b> mg 5-fluorouracilo / 100 ml solvente	<b>Absorbancia</b>
0	0
1	0.581
2	1.116
3	1.396
4	2.016
5	2.452

Con estos valores de absorbancia de cada concentración conocida se obtuvo la gráfica de la Figura 23, la cual se utiliza para calcular la concentración de 5-fluorouracilo liberado de las micelas poliméricas en las pruebas de liberación.

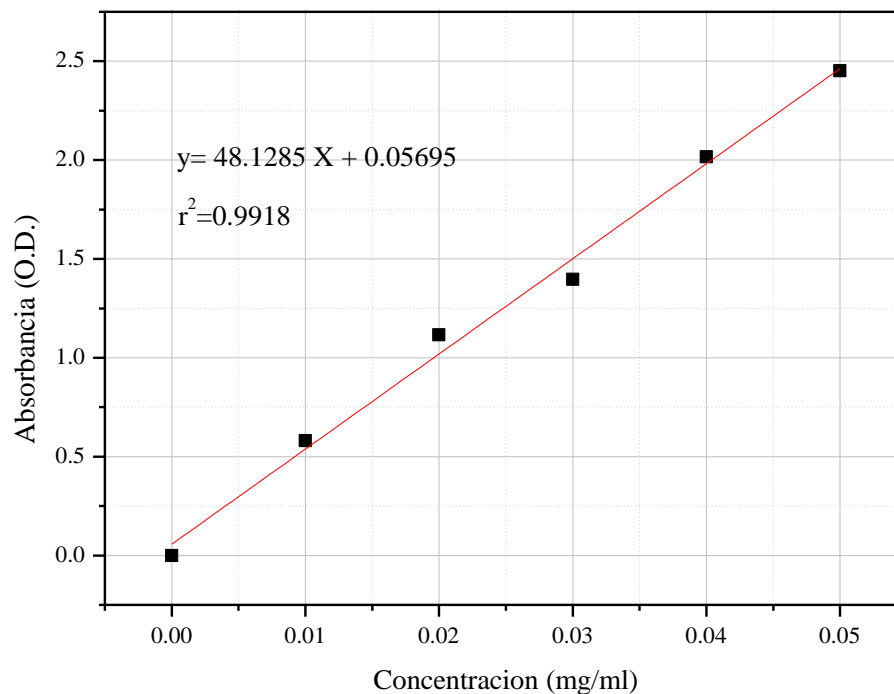


Figura 23. Curva de calibración 5-fluorouracilo.

La Ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración de 5-fluorouracilo es  $y = 48.1285X + 0.05695$ , presentando un valor de  $r^2 = 0.9918$ .

### *Análisis de liberación controlada de indometacina*

Para el estudio de liberación controlada se utilizó la técnica de diálisis a un pH de 7.2 y temperatura de 36°C, además, se dio seguimiento a las cinéticas de liberación del fármaco, con el espectrómetro UV-Vis. La Figura 24 describe gráficamente el comportamiento de liberación *invitro* de indometacina cargado en el material polimérico PEG-PVP.

Durante los primeros minutos I1, I2 e I3 mantuvieron un comportamiento similar, alcanzando una liberación aproximada del 20%, sin embargo, conforme avanzó el tiempo se apreciaron diferentes conductas de liberación, las cuales pueden estar asociados con la composición másica y morfológica que tiene los materiales poliméricos cargados.

El sistema I1 fue el que liberó indometacina de manera más rápida, logrando después de 5 horas, una liberación mayor al 80%; a partir de este tiempo la liberación se dio paulatinamente hasta alcanzar el 100% a las 44 horas.

Por otra parte, los materiales I2 e I3 presentaron comportamientos de liberación muy similares, manteniendo un gradiente de liberación más lento que I1, y que para efectos de una liberación controlada resulta conveniente. La muestra I2 presentó una liberación del 72% transcurridas las primeras 5 horas, pero alcanzó una liberación superior al 90% en las 44 horas de estudio.

Como se hace ver en el párrafo anterior la muestra I3, presentó una liberación parecida a la de I2, sin embargo, esta solo alcanzó una liberación del 85% después de 44 h, debido a que presenta una cápsula más amplia compuesta por la relación másica 2:1 del material polimérico PEG: PVP siendo el PEG más cristalino que PVP pudiendo limitar de cierta manera el fenómeno de liberación.

Los tres materiales presentaron una disminución en el gradiente de liberación de indometacina después de 5 horas, manteniendo una liberación inicial acelerada seguida de una fase de liberación sostenida, mostrando gradualmente un

comportamiento lineal. Estos sistemas micelares exhibieron un adecuado comportamiento comparándolo con los hidrogeles de PMAPTACMAAc-5 los cuales exhiben una liberación acumulativa máxima de indometacina del 82% después de 12 h [76] y también sostuvieron una mejor liberación que acuosomas de núcleos inorgánicos [77], además, los materiales poliméricos PEG-PVP ayudan a mejorar la solubilidad de este fármaco.

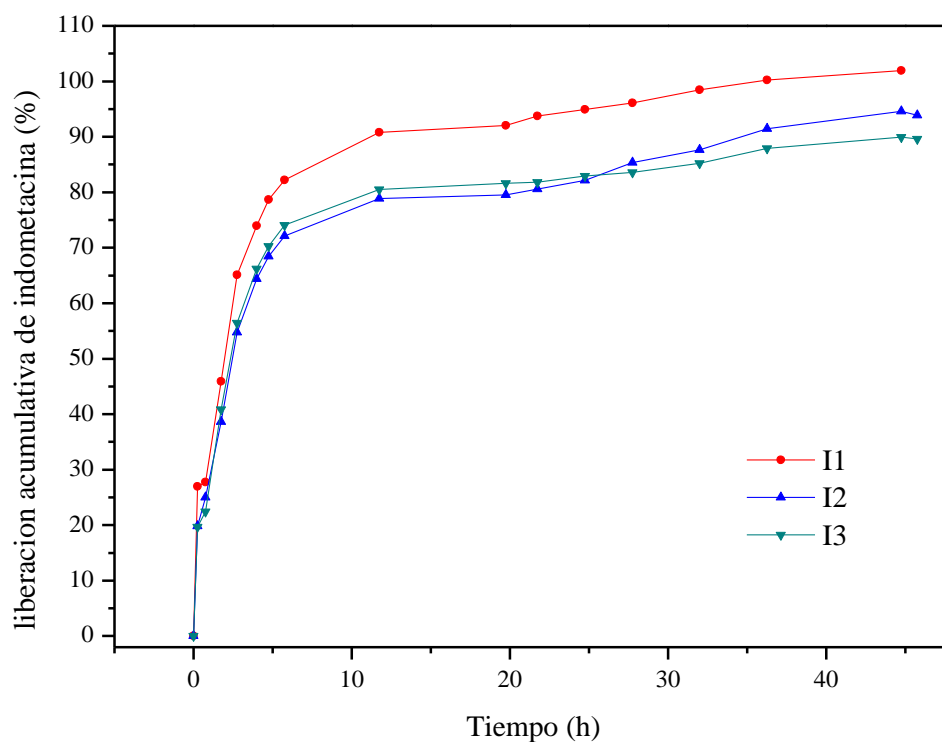


Figura 24. Gráfica de liberación acumulativa de indometacina (44 h).

### *Análisis de liberación controlada de 5-fluorouracilo*

Al igual que en el estudio de liberación controlada de indometacina, aquí también se hace uso la técnica de diálisis en las mismas condiciones y del espectrómetro UV-vis para elucidar la cantidad de fármaco liberada en el transcurso del tiempo. Consecuentemente, en la Figura 25 se aprecia el comportamiento de liberación *invitro* de 5-fluorouracilo cargado en el material polimérico PEG-PVP a diferentes relaciones de masa.

En el estudio de liberación controlada de 5-fluorouracilo se observa que dentro de las primeras 5 horas las tres muestras (F1, F2 y F3) sostuvieron una liberación inicial rápida y consecuentemente presentaron una fase de liberación sostenida, la cual es diferente para cada una de las muestras. Este comportamiento se le atribuye a la relación másica y características que presentan los materiales utilizados para encapsular, así como las características del fármaco encapsulado, en este caso con peso molecular de 130.077 g/mol.

Analizando la Figura 25 nos damos cuenta que F1 y F3 mantuvieron comportamientos similares, presentando una liberación acelerada durante las primeras 5 horas, alcanzando una liberación aproximada del 90 %, que después de 24 horas llega al 95%, liberándose solo el 5% en un transcurso de 19 horas.

Para la muestra F2 se contempló una liberación del 85% durante las primeras 5 horas, y al final de 24 horas de experimentación se registró una liberación del 94%, manteniendo mejor liberación controlada que F1 y F3. Por lo tanto, y en conjunto con los estudios morfológicos, la que mayor estabilidad en su arquitectura micelar y mejores características para la administración controlada de 5-fluorouracilo en el tiempo es la muestra F2, estando compuesta de PEG: PVP con una relación 1:1.

Estos sistemas micelares a un pH de 7.2-7.4 presentaron resultados alentadores para la liberación de fármacos. Por lo tanto, se busca que con la aplicación de 5-fluorouracilo a través de este sistema micelar de PEG-PVP ayude a disminuir las reacciones locales provocadas por las aplicaciones tópicas en formas de crema de 5-fluorouracilo al 5%, como el estudio realizado por Alcalá *et al.* [78] donde evaluó un

sistema liposomal al 0.5%, el cual disminuye significativamente las reacciones ocasionadas por este tipo de cremas.

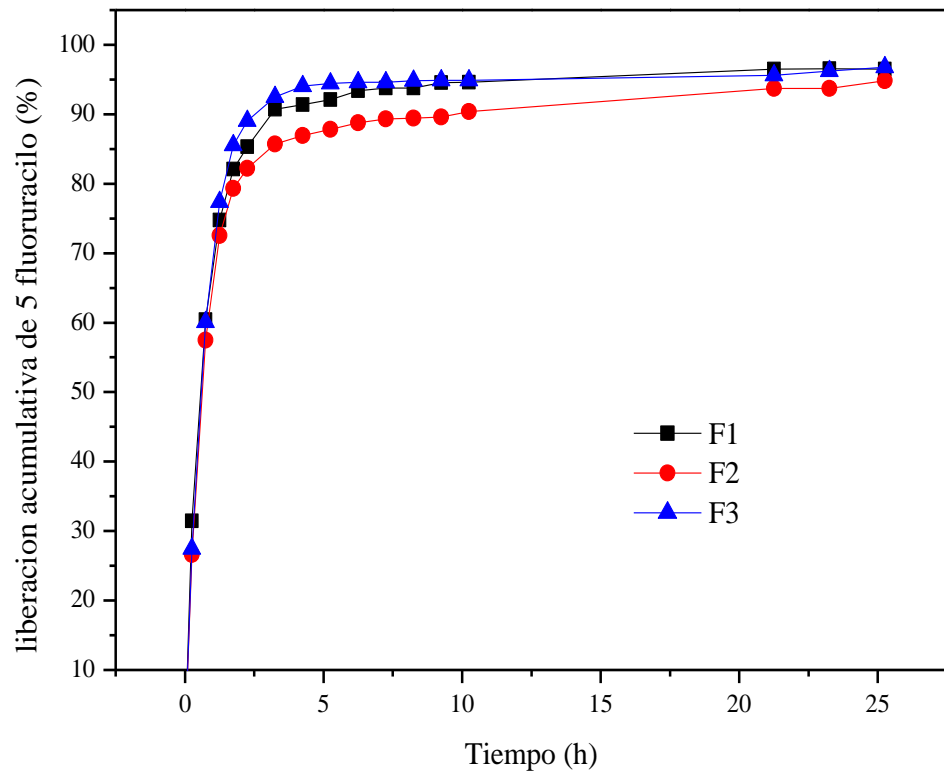


Figura 25. Gráfica de liberación acumulativa de 5-fluorouracilo (24 h).

*CAPÍTULO V*  
**CONCLUSIONES**

## Capítulo V. Conclusiones

Los sistemas poliméricos de PEG- PVP se muestran como una opción interesante para mejorar la liberación de fármacos, debido a que la combinación de las propiedades cristalinas de ambos materiales, le proporciona las características necesarias para que se pueda llevar a cabo este fenómeno.

Se debe señalar que, al variar la relación de masa de los polímeros, estos sistemas pueden presentar diferentes comportamientos; los cuales, también se ven afectados por los fármacos que se están encapsulando.

La presencia del fármaco en los sistemas poliméricos se corroboró mediante el estudio de infrarrojo, el cual proporcionó las bandas características de indometacina y 5-fluorouracilo en sus señales características. Sin embargo, se apreció un ligero apantallamiento ejercido por los sistemas poliméricos hacia el fármaco (quedando expuesto hacia el accesorio del ATR la capsula polimérica), lo cual, impide que se muestre claramente las huellas digitales de los fármacos en el espectro, todo esto, debido a las características hidrofóbicas e hidrofílicas de cada uno de ellos.

Los sistemas poliméricos P1, P2 y P3, mantienen en general formas irregulares o semicirculares, mientras que los polímeros cargados I1, I2, I3, F1, F2 y F3 conservan una tendencia a formar micelas circulares con un núcleo del fármaco hidrófobo y su capsula polimérica. El estudio de la morfología de los materiales cargados y sin cargar mostró claramente el cambio existente entre un sistema cargado con el fármaco y los sistemas de los materiales poliméricos sin cargar. Por otra parte, la morfología de los sistemas I2, I3, F2 y F3 mostraron mayor estabilidad en la arquitectura y distribución de los tamaños del sistema, aspecto que está relacionado con la capacidad de liberación, según los resultados.

Las diferentes relaciones de PEG y PVP manifestaron una mejora en la disponibilidad del fármaco, liberándolos por tiempos prolongados. El estudio de liberación de indometacina se efectuó en un tiempo de 44 horas, mientras que para el 5-fluorouracilo se realizó en 24 horas. La diferencia en los tiempos de liberación de cada uno de los fármacos estudiados varió debido al peso molecular de cada uno de

ellos, siendo la indometacina el de mayor peso molecular 357 g/mol y el de mayor tiempo de liberación, mientras que el 5-fluorouracilo tiene un peso molecular de 130.077 g/mol.

En el estudio de la liberación de fármacos mediante la técnica de diálisis se pueden observar principalmente dos fenómenos característicos. El primero consiste en una liberación rápida durante las primeras horas en la cual se presenta el mayor porcentaje de liberación, y posteriormente se da una liberación paulatina, hasta alcanzar el punto máximo para cada uno de los sistemas.

En este trabajo se observaron diferentes comportamientos de liberación, lo cual puede estar asociado a la morfología que tienen los polímeros cargados siendo la muestra I2 y F2 las que presentaron las mejores características de liberación controlada de indometacina y 5-fluorouracilo respectivamente, ya que estos dos sistemas permiten un adecuado porcentaje de liberación, en mayor tiempo y de manera más lenta.

El sistema I2 presentó una liberación mayor al 80% durante las primeras 5 horas y a partir de este tiempo la liberación se dio paulatinamente hasta alcanzar 100% a las 44 horas. Por otra parte, el 5-fluorouracilo sostuvo una liberación del 85% durante las primeras 5 horas, y al final de 24 horas de experimentación registra el 94%, manteniendo mejor liberación controlada que F1 y F3.

Lo anterior se asocia a que los sistemas I2 y F2 presentaron una mayor estabilidad en su morfología, arquitectura (circulares bien definidas), sin aglomeraciones y tamaños. Por lo tanto, con estos resultados se observa que los sistemas PEG-PVP con una relación de masa 1:1 presentan mejores características para considerarlos como potenciales materiales para ser utilizados como sistemas liberadores de fármacos anticancerígenos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S. & Mathers C. (2012) Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11, Lyon, France: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer GLOBOCAN.
2. Leiter, U., Eigentler, T. & Garbe, C. (2014) Epidemiology of skin cancer In Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer, Springer New York, 120–140.
3. Arredondo L. M. (2009) Hidrogeles, Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica* 3(5), 83–94.
4. Vilar, G., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. (2012) Polymers and drug delivery systems. *Current drug delivery* 9(4), 367–394.
5. Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E. & Ljubimova, J. Y. (2013) Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced drug delivery reviews* 65(13), 1866–1879.
6. Etheridge M. L., Campbell S. A., Erdman A. G., Haynes C. L., Wolf S. M. & McCullough J. (2013) The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9(1), 1–14.
7. Martín del Valle E. M., Galán M. A. & Carbonell R. G. (2009) Drug Delivery Technologies: The Way Forward in the New Decade. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48(5), 2475–2486.
8. López Goerne, T. M. (2011) Nanotecnología y nanomedicina: La ciencia del futuro... hoy. Ediciones Arkhé, México, D.F.
9. Grund S., Bauer M. & Fischer D. (2011) Polymer in drug delivery- state of the Art and Future Trends. *Advanced Engineering Materials* 13(3), 61-87
10. Zhang, X., Ng, H. L., Lu, A., Lin, C., Zhou, L., Lin, G. & Zhang, H. (2016) Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12(4), 853–869.
11. Ekdawi, S. N., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2016) Nanomedicine and tumor heterogeneity : Concept and complex reality. *Nano Today* 11(4), 402–414.

12. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. & Shin, D. M. (2008) Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical cancer research* 14(5), 1310–1316.
13. Fu Y. & Kao W. (2010) Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert opinion on drug delivery* 7(4), 429–444.
14. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V. & Peppas, N. A. (2010) Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 1, 149.
15. Gil, E. & Hudson, S. (2004) Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science* 29(12), 1173–1222.
16. Warren D. B., Benameur H., Porter C. J. H. & Pouton C. W. (2010) Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. *Journal of Drug Targeting* 18(10), 704–731.
17. Apalla, Z., Nashan, D., Weller, R. B. & Castellsagué, X. (2017) Skin cancer: Epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatology and therapy* 7(1), 5–19.
18. Narayanan, D. L., Saladi, R. N. & Fox, J. L. (2010) Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International journal of dermatology* 49(9), 978–986.
19. Fagundo, E., Rodríguez-García, C., Rodríguez, C., González, S., Sánchez, R., & Jiménez, A. (2011) Estudio de las características fenotípicas y exposición a radiación ultravioleta en pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 102(8), 599–604.
20. Gordon, R. (2013) Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Oncology Nursing* 29(3), 160–169
21. Haque, T., Rahman, K. M., Thurston, D. E., Hadgraft, J. & Lane, M. E. (2015) Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77, 279–289.
22. Virginia Sáez, Estíbaliz Hernáez & Leyre López (2003) Liberación controlada de fármacos. *Aplicaciones biomédicas Revista Iberoamericana de Polímeros* 4(2).

23. Aguayo, I. R., Ríos, L. & Jaén, P. (2010) Tratamiento quirúrgico vs. no quirúrgico en el carcinoma basocelular. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 101(8), 683–692.
24. Qing, W., Wang, Y., Li, H., Zhu, J. & Liu, X. (2016) Hydrogels generated by low-molecular-weight PEGylated luteolin and  $\alpha$ -cyclodextrin through self-assembly for 5-fluorouracil delivery. *RSC Advances* 6(98), 95812–95817.
25. Nawaz, A. & Wong, T. W. (2017) Microwave as skin permeation enhancer for transdermal drug delivery of chitosan-5-fluorouracil nanoparticles. *Carbohydrate polymers* 157, 906–919.
26. Khallaf, R. A., Salem, H. F. & Abdelbary, A. (2016) 5-Fluorouracil shell-enriched solid lipid nanoparticles (SLN) for effective skin carcinoma treatment. *Drug delivery* 23(9), 3452–3460.
27. Le, V. M., Wang, J. J., Yuan, M., Nguyen, T. L., Yin, G. F., Zheng, Y. H. & Liu, J. W. (2015) An investigation of antitumor efficiency of novel sustained and targeted 5-fluorouracil nanoparticles. *European journal of medicinal chemistry* 92, 882–889.
28. Mohan, A., Narayanan, S., Sethuraman, S. & Krishnan, U. M. (2014) Novel resveratrol and 5-fluorouracil coencapsulated in PEGylated nanoliposomes improve chemotherapeutic efficacy of combination against head and neck squamous cell carcinoma. *BioMed research international*.
29. Kumar Jain, S. & Puri, R. (2014) Development, characterization and in vivo localization study of topical 5-fluorouracil gels: a comparative study with conventional formulation. *Current drug delivery* 11(3), 401–414.
30. Garg, A., Rai, G., Lodhi, S., Jain, A. P. & Yadav, A. K. (2016) In-vitro and in-vivo assessment of dextran-appended cellulose acetate phthalate nanoparticles for transdermal delivery of 5-fluorouracil. *Drug delivery* 23(5), 1525–1535.
31. Depani, B. P., Naik, A. A. & Nair, H. A. (2013) Preparation and evaluation of chitosan based thermoreversible gels for intraperitoneal delivery of 5-fluorouracil (5-FU). *Acta Pharmaceutica* 63(4), 479–491.
32. Zhang, Z., Tsai, P. C., Ramezanli, T. & Michniak Kohn, B. B. (2013) Polymeric nanoparticles based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 5(3), 205–218.

33. Sabitha, M., Rejinold, N. S., Nair, A., Lakshmanan, V. K., Nair, S. V. & Jayakumar, R. (2013) Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. *Carbohydrate polymers* 91(1), 48–57.
34. Huang, Y. B., Huang, C. T., Tsou, H. Y., Fu, L. T., Fu, Y. S., Tsai, Y. H. & Wu, P. C. (2013) The transport effect of submicron emulsions on 5-fluorouracil topical application. *Journal of microencapsulation* 30(5), 425–431.
35. Li, N., Zhao, L., Qi, L., Li, Z. & Luan, Y. (2016) Polymer assembly: Promising carriers as co-delivery systems for cancer therapy. *Progress in Polymer Science* 58, 1–26.
36. Kelley, E. G., Albert, J. N., Sullivan, M. O. & Epps III, T. H. (2013) Stimuli-responsive copolymer solution and surface assemblies for biomedical applications. *Chemical Society Reviews* 42(17), 7057–7071.
37. Xu, Z., Liu, S., Kang, Y. & Wang, M. (2015) Glutathione-responsive polymeric micelles formed by a biodegradable amphiphilic triblock copolymer for anticancer drug delivery and controlled release. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 1(7), 585–592.
38. Gupta, R., Shea, J., Scaife, C., Shurlygina, A. & Rapoport, N. (2015) Polymeric micelles and nanoemulsions as drug carriers: therapeutic efficacy, toxicity, and drug resistance. *Journal of Controlled Release* 212, 70–77.
39. Owen, S. C., Chan, D. P. & Shoichet, M. S. (2012) Polymeric micelle stability. *Nano Today* 7(1), 53–65.
40. Martin J. R., Johnson J. F. & Cooper A. R. (1972) Mechanical properties of polymers: The influence of molecular weight and molecular weight distribution. *J. Macromol. Sci. Polym. Rev.* 8, 57–199.
41. Nunes R. W., Martin J. R. & Johnson J. F. (1982) Influence of molecular weight and molecular weight distribution on mechanical properties of polymers. *Polym. Eng. Sci.* 22, 205–228.
42. Sethia S. & Squillante E. (2004) Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. *Int J Pharm* 272, 1–10.
43. Barmpalexis, P., Koutsidis, I., Karavas, E., Louka, D., Papadimitriou, S., Bikiaris, D. & Peg, P. V. P. (2000) Development of PVP / PEG mixtures as appropriate carriers for the preparation of drug solid dispersions by melt

- mixing technique and optimization of dissolution using artificial neural networks. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85(3), 1219–1231.
44. Miller, T., Van Colen, G., Sander, B., Golas, M. M., Uezguen, S., Weigandt, M. & Goepferich, A. (2013) Drug loading of polymeric micelles. *Pharmaceutical Research* 30, 584–595.
  45. Hałupka-Bryl, M., Bednarowicz, M., Dobosz, B., Krzyminiewski, R., Zalewski, T., Wereszczyńska, B. & Nagasaki, Y. (2015) Doxorubicin loaded PEG-b-poly (4-vinylbenzylphosphonate) coated magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 384, 320–327.
  46. Zhang, C., Zhang, J., Li, W., Feng, X., Hou, M. & Han, B. (2008) Formation of micelles of Pluronic block copolymers in PEG 200. *Journal of colloid and interface science* 327(1), 157–161.
  47. Zhang, K., Tang, X., Zhang, J., Lu, W., Lin, X., Zhang, Y. & He, H. (2014) PEG–PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* 183, 77–86.
  48. Prudic, A., Kleetz, T., Korf, M., Ji, Y. & Sadowski, G. (2014) Influence of copolymer composition on the phase behavior of solid dispersions. *Molecular pharmaceutics* 11(11), 4189–4198.
  49. Gupta, B. S., Chen, B. R. & Lee, M. J. (2015) Solvation consequences of polymer PVP with biological buffers MES, MOPS, and MOPSO in aqueous solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 91, 62–72.
  50. Skoog, D. A., Holler, J. H. & Nieman, T. A. (2001) *Principios de Análisis Instrumental*, 5a Edición. McGraw Hill. Madrid, España.
  51. Nishikida, K., Nishio, E. & Hannah, R. W. (1995) Selected applications of modern FT-IR techniques.
  52. Lindenberg, C., Cornel, J., Schöll, J. & Mazzotti, M. (2012) ATR-FTIR Spectroscopy. *Industrial Crystallization Process Monitoring and Control*.
  53. Gómez, R., & Murillo, R. (2005) *Espectroscopia infrarroja*. Facultad de ciencias, UNAM. Consultado 3 de junio del 2017. Obtenido de: <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>
  54. Perkin Elmer (2016) *Polymer Applications Compendium*, application note infrared spectroscopy human health- environment health. Consultado 3 de

- junio del 2017. Obtenido de: [https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/COMP\\_Polymer\\_Applications\\_Compendium\\_0130201.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/COMP_Polymer_Applications_Compendium_0130201.pdf)
55. Perkin Elmer (2004) Technical note , FT-IR spectroscopy, consultado 3 de junio del 2017, Obtenido de: [https://shop.perkinelmer.com/Content/technicalinfo/tch\\_atraccessories.pdf](https://shop.perkinelmer.com/Content/technicalinfo/tch_atraccessories.pdf) 2004
56. Carter, C. B., & Williams, D. B. (Eds.) (2016) *Transmission Electron Microscopy: Diffraction, Imaging, and Spectrometry*. Springer.
57. Williams, D. B., Carter, C. B. & Veyssiere, P. (1998) *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science*. MRS Bulletin-Materials Research Society 23(5), 47.
58. Reimer, L. (2013) *Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. Springer.
59. Nellist, P. D. & Pennycook, S. J. (Eds.) (2011) *Scanning Transmission Electron Microscopy: Imaging and Analysis*. Springer.
60. Tanaka, N. (Ed.) (2014) *Scanning transmission electron microscopy of nanomaterials: basics of imaging and analysis*. World Scientific.
61. Suryanarayana, C. & Norton, M. G. (2013) *X-ray diffraction: a practical approach*. Springer Science & Business Media.
62. Bermúdez-Polonio, J. (1981) *Métodos de difracción de rayos X: principios y aplicaciones*. Ediciones Pirámide.
63. Rodríguez, M. (1982) *La difracción de los rayos X*. Editorial Alhambra.
64. Borchert, H. (2014) *Solar cells based on colloidal nanocrystals*. Springer Science & Business Media.
65. Zambito, Y., Pedreschi, E. & Di Colo, G. (2012). Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—A case study. *International journal of pharmaceutics* 434(1), 28–34.
66. Modi, S. & Anderson, B. D. (2013) Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Molecular pharmaceutics* 10(8), 3076–3089.
67. Thassu D., Deleers M. & Pathak Y. (2007) *Nanoparticulate Drug Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, (First Edition) Boca Raton, FL: CRC Press.

68. Koh, P. T., Chuah, J. N., Talekar, M., Gorajana, A. & Garg, S. (2013) Formulation development and dissolution rate enhancement of efavirenz by solid dispersion systems. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 75(3), 291.
69. Miller, T., van Colen, G., Sander, B., Golas, M. M., Uezguen, S., Weigandt, M. & Goepferich, A. (2013) Drug loading of polymeric micelles. *Pharmaceutical research* 30(2), 584–595.
70. Chao, Y. C., Su, S. K., Lin, Y. W., Hsu, W. T. & Huang, K. S. (2013) Preparation and Application of PEG/PVP Copolymers. *Journal of Polymers and the Environment* 21(1), 160–165.
71. Taylor L. S. & Zografí G. (1997) Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions, *Pharm. Res.* 14(12), 1691–1698.
72. Dupeyrón D., Kawakami M., Ferreira A. M., Cáceres P. R., Rieumont J., Azevedo R. B. & Carvalho J. C. T. (2013) Design of indomethacin-loaded nanoparticles: effect of polymer matrix and surfactant. *Int. J. Nanomedicine* 8, 3467–3477.
73. Gong K., Darr J. A. & Rehman I. U. (2006) Supercritical fluid assisted impregnation of indomethacin into chitosan thermosets for controlled release applications. *Int. J. Pharm* 315(1), 93–98.
74. Banerji, B., Pramanik, S. K., Mandal, S., Maiti, N. C. & Chaudhuri, K. (2012) Synthesis, characterization and cytotoxicity study of magnetic ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles and their drug conjugate. *RSC Advances* 2(6), 2493–2497.
75. Escobar, J. L., García, D. M., Zaldivar, D. & Katime, I. (2002) Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana* 3, 3.
76. Mishra, R. K., Ramasamy, K., Ban, N. N. & Majeed, A. B. A. (2013) Synthesis of poly [3(methacryloylamino) propyl trimethylammonium chloride comethacrylic acid] copolymer hydrogels for controlled indomethacin delivery. *Journal of Applied Polymer Science* 128(5), 3365–3374.
77. Rojas, I., López, A., Quirino, C., Cárdenas, H. & García, R. (2012) Perfil de liberación de indometacina desde acuosomas utilizando el método de diálisis. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* 43(2), 61–65.

78. Alcalá, D., Torres, S., Medina, A., Barba, J. F., Soto, J. A., Rodas, C. & Cruz, J. S. (2014) Estudio comparativo entre 5-fluorouracilo liposomal a 0.5% en crema y 5-fluorouracilo a 5% en crema en el tratamiento de la queratosis actínica. *Dermatología Revista mexicana* 58(6), 489–500.