



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

“Nanogeles sensibles a pH y medio reductor para la liberación de Curcumina y 5-Fluorouracilo en Cáncer de colon”

TRABAJO DE TESIS

Presentado por

QFB. Katherine Jane Litwin

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

Director de tesis

Dra. Aracely Serrano Medina

Co-Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

TIJUANA, B.C. JUNIO DEL 2023

Hoja de aprobación

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.347
Tijuana, B.C., a 05 de junio, 2023

C. Katherine Jane Litwin
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente


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

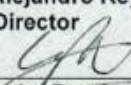
Es propuesto, por los C. Dr. Aracely Serrano Medina y
Dr. José Manuel Cornejo Bravo

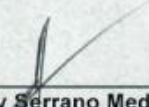
Quiénes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema "Nanogeles sensibles a pH y medio reductor para la liberación
de Curcumina y 5-Fluorouracilo en Cáncer de colon".

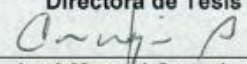
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

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


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora


Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director de Tesis

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mi supervisora, la Dra. Aracely Serrano Medina, por haberme incluido en su equipo de trabajo y darme la oportunidad de desarrollar mis habilidades como investigadora realizando este posgrado, mis palabras no son suficientes para describir la excelente persona que me ha guiado.

Expreso mi más sincero agradecimiento al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Biofarmacia, por su confianza, sus enseñanzas y sus consejos para el desarrollo del proyecto, sus valiosos aportes al área de investigación me han ayudado a mejorar la calidad de mi trabajo y desarrollo profesional.

A las maestras Yuritzzi Vargas, Bibiana Cota y Alondra Montañez por compartir su conocimiento conmigo, tiempo, disposición y amistad. A todos mis compañeros de posgrado por haber convivido siempre cordialmente y con respeto.

A mi pareja Josué por apoyarme siempre incondicionalmente en todo lo que he decidido hacer alentándome a seguir adelante. A mis mascotas por ser un apoyo emocional enorme para mí.

Me gustaría agradecer el apoyo financiero brindado por CONACYT que me permitió realizar esta investigación y presentar mis hallazgos.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradeciendo a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, reconociendo al laboratorio de biofarmacia, donde se desarrolló el presente proyecto de investigación bajo la dirección de la Dra. Aracely Serrano Medina y el Dr. José Manuel Cornejo Bravo, en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas e Ingeniería. Gracias al Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana por la colaboración del Dr. Ignacio Alfredo Rivero Espejel en la etapa de caracterización. A todo el personal académico y administrativo de la Universidad Autónoma de Baja California. Finalmente agradezco el apoyo obtenido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de estudios de posgrado y el desarrollo de esta investigación a través de una beca con número 1068085.

ÍNDICE

Hoja de aprobación	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
INDICE o CONTENIDO	V
Lista de símbolos y abreviaturas	VIII
Lista de Tablas	X
Lista de Figuras	XI
Vita y área de estudio	XII
Resumen	XIII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	14
Antecedentes	18
Justificación.....	21
Hipótesis	23
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO II. TEORIA GENERAL	25
Generalidades del cáncer.....	26
Estadísticas actuales del cáncer	28
Cáncer de colon	31
Metástasis de cáncer de colon.....	33
Participación de glutatión en el cáncer.....	40
Tratamiento contra el cáncer de colon.....	41
Terapias alternativas contra el cáncer de colon.	47
Sistema de liberación de fármacos.....	51
Nanogeles	52
Polimerización en emulsión.....	54
Nanogeles sensibles a estímulos ambientales específicos.	55
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	58

III.1. Materiales y reactivos.....	59
III. 1.2 Equipos.....	61
III.2 Métodos.....	63
III.2.1 Síntesis monómeros carboxialquilmecrilamidas.....	63
III. 2.2 Caracterización de los monómeros carboxialquilmecrilamidas.....	64
III.2.2.1 Espectrofotometría de infrarrojo.....	64
III.2.3 Síntesis de nanogeles de CAM10/BAAC Y CAM7/BAAC mediante el método de polimerización en emulsión.....	64
III.2.4 Técnicas de caracterización para los nanogeles sintetizados.....	66
III.2.5 Estabilidad coloidal de los Nanogeles.....	67
III.2.6 Estudios de degradación de los nanogeles sintetizados en medio redox.....	68
III.2.7 Cargado de los Nanogeles con farmacos.....	68
2.7.1 Cargado de los Nanogeles con 5-FU.....	69
III.2.7.2 Cargado de los Nanogeles con Curcumina.....	70
III.2.8 Cinética de liberación <i>in vitro</i> de 5-FU.....	71
III.2.8.1 Cinética de liberación <i>in vitro</i> de Curcumina.....	71
III.2.9 Ensayo de citotoxicidad de los Nanogeles cargados con 5-FU y CUR.....	72
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	75
IV.1. Síntesis y caracterización de los monómeros carboxialquilmecrilamidas.....	76
IV.1.1 Caracterización de los monómeros carboxialquilmecrilamidas por espectrofotometría de infrarrojo.....	77
IV.2. Síntesis y caracterización de Nanogeles de CAM/10/BAAC y CAM7/BAAC mediante el método de polimerización en emulsión.....	78
IV.2.1. Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de Nanogeles CAM7/BAAC y CAM10/BAAC.....	80
IV.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	81
IV.4 Estudios de degradación de los Nanogeles sintetizados en medio redox.....	82
IV. 4.1. Hidrólisis de Nanogeles CAM10/BAAC en buffer a pH 7.4.....	82
IV. 4.2 Hidrólisis de Nanogeles CAM7/BAAC en buffer a pH 7.4.....	84
IV.6 Cinética de liberación <i>in vitro</i> de 5-FU y CUR.....	88
IV.7. Ensayo de citotoxicidad de los Nanogeles cargados con 5-FU.....	91
CAPITULO V. CONCLUSIONES.....	96
CAPITULO VI. REFERENCIAS.....	99

ANEXOS

ANEXO 1. Cálculos para la síntesis de anogeles de por el método de polimerización en emulsión. ...	107
ANEXO 2. Curva de calibración para el cargado de Curcumina con etanol por UV-VIS	109
ANEXO 3. Curva de calibración para el cargado de 5-Fluorouracilo con etanol por UV-VIS	110
ANEXO 4. Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles cargados con CUR.	111
ANEXO 5. Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles cargados con 5-FU.	113
ANEXO 6. Curvas de Calibración para liberación de Curcumina	115
ANEXO 7. Curvas de Calibración para liberación de 5-FU.....	117
ANEXO 8. Fracciones liberadas de CUR a diferentes pH.....	119
ANEXO 9. Fracciones liberadas de CAM10/BAAC-CUR a diferentes pH.	120
ANEXO 10. Fracciones liberadas de CAM7/BAAC-CUR a diferentes pH.	121
ANEXO 11. Fracciones liberadas de 5-FU a diferentes pH.	122
ANEXO 12. Fracciones liberadas de CAM10/BAAC-5-FU a diferentes pH.	123
ANEXO 13. Fracciones liberadas de CAM7/BAAC-5-FU a diferentes pH.	124

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
%p/v	Porcentaje peso/volumen
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
μ m	Micrómetro
Kg	Kilogramo
Mg	Miligramo
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
5-FU	5-Fluorouracilo
CUR	Curcumina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APS	Persulfato de amonio
CAM10	Ácido 11-metacriloilamido undecanóico
CAM7	Ácido 8-metacriloilamido aminooctanoico
M10	11-metacriloilamidoundecanóico
M7	8-metacriloilamido aminooctanoico
DDS	Sistemas de administración de fármacos
DE	Desviación estándar
Dh	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica
BAAC	N,N'-Bis(acryloyl)cysteamine
DBS	Dodecilbesulfonato de sodio
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
GSH	Glutación (reducido)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer

IC50	Concentración inhibitoria 50
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
MTT	Bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NGs	Nanogeles
NPs	Nanopartículas
O/W	Aceite en agua
O/W/O	Aceite en agua en aceite
PCAM10	Poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico)
PCAM7	Poli-(ácido 8-metacriloilamido octanóico)
PDI	Índice de polidispersidad
pH	Potencial de hidrógeno

LISTA DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer de colon aprobados por la FDA.	42
Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de los Nanogeles CAM10/BAAC	65
Tabla 3. Reactivos utilizados para la síntesis de los Nanogeles CAM7/BAAC	66
Tabla 4. Concentraciones de glutatión.....	68
Tabla 5. Tratamientos para ensayo de citotoxicidad.....	73
Tabla 6. IRS 2 monómeros	78
Tabla 7. PDI y Dh de los Nanogeles CAM10/BAAC y CAM7/BAAC sintetizados	79
Tabla 8. Nanogeles de CAM10/BAAC a diferentes pH.	80
Tabla 9. Nanogeles de CAM7/BAAC a diferentes pH.	80
Tabla 10. Nanogeles liofilizados y reconstituidos.	81
Tabla 11. Resultados de hidrólisis de los Nanogeles CAM10/BAAC a pH 7.4 con diferentes concentraciones de glutatión	80
Tabla 12. Resultados de hidrólisis de los Nanogeles CAM7/BAAC a pH 7.4 con diferentes concentraciones de glutatión.	82
Tabla 13. Resultados de la capacidad de carga y eficiencia de carga de 5-FU de ambas formulaciones de Nanogeles.	83
Tabla 14. Resultados de la capacidad de carga y eficiencia de carga de CUR de ambas formulaciones de Nanogeles.	87
Tabla 15. Imágenes de células tratadas con Nanogeles cargados con CUR y 5- FU por el método de MTT obtenidas de FLoid™ Cell Imaging Station.	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Datos epidemiológicos mundiales	29
Figura 2. Nuevos casos y muertes por cáncer de colon	30
Figura 3. Etapas y desarrollo del cáncer colorrectal.	35
Figura 4. Microambiente tumoral.	37
Figura 5. Estructura química de 5-Fluorouracilo.	46
Figura 6. Estructura química de la Curcumina.	47
Figura 7. Síntesis para la obtención de carboxialquilmecrilamidas.	63
Figura 8. Monómeros obtenidos a partir de la síntesis de carboxialquilmecrilamidas	76
Figura 9. Espectrofotometría de infrarrojo de los monómeros M7 y M10.	77
Figura 10. Nanogeles CAM10/BAAC y CAM7/BAAC sintetizados.	79
Figura 11. Imágenes de microscopia FESEM.....	82
Figura 12. Hidrólisis de Nanogeles CAM10/BAAC a pH 7.4.	84
Figura 13. Hidrólisis de Nanogeles CAM7/BAAC a pH 7.4.	86
Figura 14. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC 5-FU libre a pH 7.4	86
Figura 15. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC CUR libre a pH 7.4	86
Figura 16. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC 5-FU libre a pH 1.2	89
Figura 17. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC CUR libre a pH 1.2	89
Figura 18. Viabilidad celular de Nanogeles CAM10/BAAC Y CAM7/BAAC con 5-FU.	92
Figura 19. Viabilidad celular 5-FU.....	93
Figura 20. Viabilidad celular de CUR.....	93
Figura 21. Viabilidad celular de CAM7/BAAC y CAM10/BAAC cargadas con 5-FU.....	94
Figura 22. Viabilidad celular de CAM7/BAAC y CAM10/BAAC cargadas con CUR.....	95

VITA Y ÁREA DE ESTUDIO

Katherine Jane Litwin; katherine.litwin@uabc.edu.mx

Estudiante de Maestría en Ciencias en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC campus Tijuana, Q.F.B. Egresada de la U.A.B.C. Campus Tijuana.

RESUMEN

La síntesis de Nanogeles (NG's) que responden a estímulos de manera selectiva, especialmente en microambiente tumoral son capaces de liberar cargas ya sean cargas positivas o negativas en respuesta al cambio del pH y medio reductor. Estos NG's sensibles con diámetros que van de 1 nm a 1000 nm, están compuestos por polímeros hidrofílicos reticulados con una cubierta que se estabiliza gracias al poli (carboxialquil metacrilamidas) (PCAM's) utilizando la metodología de polimerización en emulsión. Se produjeron NG's con diámetros hidrodinámicos que oscilaron entre 100 y 150 nm, determinados por dispersión de luz dinámica (DLS). Los resultados indican que el tamaño de partícula y el tipo de PCAM es adecuado ya que su tamaño se puede adaptar para su liberación de acuerdo con las características fisicoquímicas que presentan los fármacos, estos materiales tienen potencial como sistemas de liberación controlada por vía oral. En el presente trabajo de investigación se sintetizaron NG's sensibles al pH y medio reductor cargados con 5-Fluorouracilo y Curcumina con potencial de utilidad para el tratamiento contra el cáncer de colon a base de poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico) (PCAM10) y poli-(ácido 8-metacriloilamido octanoico) (PCAM7) reticulados con el entrecruzante N,N'-bis (acriloil) cistamina (BAAC) para una cinética de liberación prolongada a base de la hidrofobicidad de los compuestos.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los principales factores de mortalidad en el mundo, en el 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 18 millones de casos nuevos. En México, esta patología es la tercera causa de muerte en el país, según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el cáncer (IARC), los cuales los más comunes en México son: mamarios, próstata, pulmonar y colorrectal; esta última patología ha aumentado en los últimos 20 años en el país. Debido al diagnóstico tardío, por tener una rápida formación de metástasis y alta tasa de transferencia a nivel de torrente sanguíneo se ha registrado un incremento en la mortalidad en el país según la Sociedad Mexicana de Oncología. (SMeO).(Vargas-ruiz, 2023) (Arvelo et al., 2015).

Las opciones de tratamiento contra el cáncer como quimioterapia, cirugía y radiación a menudo se asocian con efectos secundarios graves y toxicidad, lo cual afecta significativamente a la calidad de vida de los pacientes. Por ello, y debido a que las células cancerígenas muestran resistencia ante la radioterapia y quimioterapia ha sido parte crucial en el reto para encontrar un tratamiento eficiente y eficaz contra el cáncer colorrectal.(Wong et al., 2019).

Los sistemas de administración de fármacos quimioterapéuticos basados en nano transportadores nos ayudan a abordar este tipo de problemas, ya que tales formulaciones ofrecen una oportunidad para dirigirse al tejido tumoral de forma pasiva.(Wang et al., 2016).

Los nano portadores o nano partículas (NP's) que responden a los estímulos han ganado mucha atención por su capacidad de administrar fármacos de forma selectiva, especialmente en el microambiente tumoral. El microambiente tumoral presenta condiciones inusuales, como un pH elevado, temperatura y medio reductor

(concentración de glutatión), que son aprovechadas por estas NP's para dirigirlos de forma eficaz y descargar el fármaco anti cancerígeno sin causar ningún daño a los tejidos sanos.

Las NP's sensibles al pH, son capaces de liberar cargas en respuesta al cambio del entorno extracelular del tumor el cual es más ácido (pH 6,5) que la sangre (pH 7,4).(Du et al., 2010).(Iyer & Das, 2021).

La concentración de GSH (glutatión) en la matriz intracelular de las células tumorales es entre 100 y 1000 veces mayor que en el exterior celular. Por este motivo, se ha explotado el enlace desulfuro como activador de la reducción para la administración de NP's las cuales muestran una mayor liberación intracelular de fármacos en respuesta al alto nivel de GSH.(Lee et al., 2017).

Las NP's con diámetros que van de 1 nm a 1000 nm, están compuestos por polímeros hidrofílicos reticulados. Poseen un alto contenido en agua, una elevada superficie específica, biocompatibilidad y una estabilidad deseable. Son capaces de responder a estímulos externos cambiando sus propiedades físico-químicas, como el volumen, el contenido de agua, el índice de refracción, la permeabilidad de la red interior y la hidrofiliidad. (Zha et al., 2011).

Se ha demostrado que las NP's sensibles al pH y medio oxido-reductor (redox) para la administración de fármacos por vía oral mejoran la estabilidad de la administración de fármacos y logran una liberación controlada en los intestinos.(Liu et al., 2017).

En el presente trabajo de investigación se sintetizaran Nanogeles Sensibles al pH y Medio reductor cargados con 5-Fluorouracilo y Curcumina con potencial de utilidad para el tratamiento para el CCR a base de poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico) (PCAM10) y poli-(ácido 8-metacriloilamido octanoico) (PCAM7) reticulados con el entrecruzante N,N'-bis (acriloil) cistamina (BAAC) para una sensibilidad a las condiciones reductoras del colon y una cinética de liberación prolongada a base de la hidrofobicidad de los compuestos.(Cornejo-Bravo et al., 2017).

Antecedentes

El desarrollo de nuevos polímeros funcionales, para la fabricación de Nanogeles poliméricos en aplicación a la ciencia biomédica, nos ha dado ventaja en proporcionar portadores de administración de fármacos que pueden mostrar su efecto en una ubicación precisa en respuesta a las características únicas de la enfermedad.

La metodología y técnicas de polimerización ampliamente aplicada para la síntesis de Nanogeles con respuesta a medios oxido reductor los cuales incorporan elementos redox en forma de gesticulante en la matriz del polimérica, le confiere características distintivas, lo cual le da la facilidad de internalización por parte de las células, con una menor afinidad de acumulación en tejidos sanos. La aplicación de estrategias sintéticas con unidades redox y otros estímulos como respuesta a pH, han aumentado su potencial para la administración de fármacos nanotecnológicos.(Kumar et al., 2019).

En un estudio se sintetizaron NP's de quitosano cargadas con 5-FU y recubiertas con diferentes proporciones del polímero Eudragit S-100, el cual, se disuelve a pH colónico.

Como resultados en general para la relación fármaco: polímero 1:3, se obtuvieron nano partículas con formas esféricas, con un rango de tamaño de 139 nm, una superficie lisa, valores de índice de polidispersidad (PDI) < 0.2 y un Potencial zeta negativo. De igual manera, mostraron una eficiencia de encapsulación del 69%, una carga de fármaco de 28% y una liberación del 82% a las 24 h luego de alcanzar un pH básico (7.0), esto último atribuido a los grupos carboxilo presentes en Eudragit S-100 que se ionizan en medios neutros a alcalinos; mientras que las NP's sin recubrimiento

liberaron el 70% del fármaco en pH ácido, antes de llegar al líquido colónico debido a la degradación del quitosano. Por lo tanto, estas NP's se consideraron como un excelente nano portador de fármacos para liberación controlada y específica en colon.(Tummala et al., 2015).

El quitosano que es un polisacárido obtenido a partir de la desacetilación del quitosano, formado por glucosamina unida por enlaces β -1,4-glicosídicos. Presenta excelentes propiedades, como la no toxicidad, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad. Pero la escasa solubilidad del quitosano imita sus aplicaciones prácticas. Por lo tanto, se necesita una modificación química para mejorar su solubilidad.

La presencia de grupos amino e hidroxilo activos en el quitosano facilita la modificación química del mismo lo cual incluye sulfonación, la co-polimerización, la cuaterización y la carboxialquilación, entre otras condiciones ácidas, la glucosamina se ioniza, lo que indica que el quitosano tiene una naturaleza catiónica. Por lo tanto, puede formar nano compuestos con polímeros aniónicos. Esta serie de características hacen que las NPs basadas en quitosano sean portadores de fármacos antitumorales.(Li et al., 2021).

En otro estudio, se sintetizaron Nanogeles cargados con Curcumina, mostrando una aceleración de la liberación de la Curcumina a un pH de 5 (imitando el pH de los lisosomas) para los Nanogeles reticulados con EGDMA y DVA, y, en el caso de los Nanogeles reticulados con BAAC, la liberación fue aún más rápida a pH 5 con la adición de 10 mM de GSH. La viabilidad celular de la línea celular de cáncer de colon humano (HCT-116) en contacto con los Nanogeles cargados de Curcumina mostró que

el IC50 se redujo de 5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando la Curcumina se cargó dentro de los Nanogeles reticulados con DVA y BAC.

Los estudios preliminares de toxicidad aguda en ratones mostraron que los Nanogeles vacíos reticulados con EGDMA y reticulados con BAAC y con PDEAEM no eran tóxicos hasta concentraciones de 40 mg/kg. La nano formulación consistente en Curcumina cargada en el interior de Nanogeles con núcleo de PDEAEM y cubierta de PEG reticulados con DVA o BAAC tiene un excelente potencial para la terapia del cáncer de colon.(Manzanares-Guevara et al., 2020).

En 2016, se sintetizaron Nanogeles con carboxialquilmecrilatos, en proporciones de 5, 10 y 15% utilizando el método de polimerización por dispersión. La parte experimental se llevó a cabo utilizando NIPAAm y como co-monómeros los CAM en concentraciones previamente mencionadas. Después de hacer la polimerización, por dispersión, las nano partículas fueron analizadas por dispersión de luz dinámica (DLS) para determinar tamaños y transiciones con la temperatura. Los resultados que se pudieron observar fueron que entre más sal de M4 se incorporaba en la reacción para la síntesis de micro geles, decrecían su tamaño, pero a la vez bajaba levemente su temperatura de transición. La disminución de tamaño indicó que la sal actuaba de surfactante en la reacción. Por otra parte, al momento de utilizar la sal de M11, aumentó su poder de surfactante creando nano partículas de hasta 27 nm, pero como consecuencia se pierde la temperatura de transición, ya que el tamaño no se veía afectado respecto a la temperatura. Finalmente, se pudo concluir que sí era posible crear geles sensibles a pH y temperatura utilizando NIPAAm y M4K, ya que con esta combinación era posible tener micro geles más pequeños que utilizando solamente

geles de NIPAAm; sin embargo, en el caso de las partículas de M10K con NIPAAm, se obtenían nano partículas pero por ser más hidrofóbica, disminuyó la temperatura de transición aunque también se observa que sirve como estabilizador en la síntesis.(Castro-Vidal et al., 2016).

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

Justificación

Como ya se ha mencionado anteriormente, es importante encontrar nuevas formas de administrar el fármaco 5-FU para lograr una liberación más localizada para cáncer de colon, una de las alternativas planteadas puede ser a través de la síntesis de

Nanogeles; en este trabajo proponemos la nano formulación de NGs sintetizados con el monómero CAM10 y CAM 7 para evaluar la liberación de 5-FU y Curcumina a diferentes valores de pH y su citotoxicidad en una línea celular de cáncer. Esta investigación se realizará con el fin de conocer si estos Nanogeles, en específico, son capaces de liberar al 5-FU y Curcumina en un ambiente con pH similar al que se encuentra en el colon. Para esto, los Nanogeles primero se sintetizarán, se purificarán, se caracterizarán y se les realizarán pruebas de estabilidad.

Después, se realizará el cargado del 5-FU y Curcumina, finalmente, se hará una cinética de liberación *in vitro*, así como un estudio de citotoxicidad mediante el ensayo MTT en una línea celular de cáncer (HTC-116). La importancia de esta investigación radica en que el 5-FU, que es el tratamiento quimioterapéutico convencional del cáncer de colon, provoca muchos efectos tóxicos al distribuirse por todo el organismo luego de una administración intravenosa, además de otras limitantes. Además de que la administración por vía oral no es utilizada por la biodisponibilidad errática. Por tal razón, utilizar sistemas de administración de fármacos, como la combinación del mismo citostático con un extracto de Curcumina, el cual ha demostrado en muchos estudios actuar de manera sistémica como sinérgica para poder llegar a su punto de acción, cabe mencionar que la Curcumina es un extracto con propiedades anti cancerígenas el cual lo convierte en el perfecto candidato para la combinación de este componente como el fármaco 5-Fluorouracilo, tal como los NG's sensibles a estímulos, podrían evitar estas limitantes al liberar su contenido en el sitio objetivo, mejorando la eficacia terapéutica mejorada y disminuyendo efectos secundarios.

Con ayuda de esta investigación se logrará recabar datos en beneficio del funcionamiento de este tipo de nano formulaciones y su posterior uso o aplicación *in vivo* para que, en un futuro, pueda ser utilizada como un nuevo sistema de administración de fármacos en el que se eviten los efectos secundarios y mejore la eficacia del tratamiento anti cancerígeno con 5-FU en los pacientes con cáncer de colon, al tratarse de una terapia más dirigida.

Hipótesis

Los Nanogeles de ácido 11-metacriloilamido undecanóico y 8-metacriloilamido aminooctanoico responderán a pH alcalinos y medios reductores liberando 5-FU y CUR en un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro* y tendrán actividad antineoplásica en líneas celulares de cáncer de colon.

Objetivos

Objetivo general

Sintetizar Nanogeles de ácido 11-metacriloilamido undecanóico y 8-metacriloilamido aminooctanoico, entrecruzados con N,N'-bis (acriloil) cistamina que sean sensibles a medio reductor y al pH para la liberación de 5-Fluorouracilo (5-FU) y Curcumina (CUR) en colon.

Objetivos específicos

1. Sintetizar monómeros a partir del ácido 8-aminooctanoico y ácido 11-undecanóico por el método de Schotten-Baumann.

2. Caracterizar los monómeros de carboxialquilmetacrilamidas por medio de Espectrofotometría de infrarrojo.
3. Sintetizar Nanogeles de ácido 11-metacriloilamido undecanóico y 8-metacriloilamido aminooctanoico, entrecruzados con N,N'-bis (acriloil) cistamina mediante polimerización en emulsión con dodecilsulfonato de sodio como tensoactivo.
4. Caracterizar los Nanogeles sintetizados mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Potencial Zeta y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo FESEM.
5. Evaluar la respuesta de los Nanogeles sintetizados al pH, así como su estabilidad al proceso de liofilización y reconstitución.
6. Realizar estudios de degradación de los Nanogeles sintetizados en medio redox.
7. Realizar el cargado de 5-FU y CUR a los Nanogeles sintetizados para cuantificar su eficiencia de carga.
8. Determinar la cinética de liberación de 5-FU y CUR mediante ensayos *in vitro* a diferentes valores de pH.
9. Evaluar la citotoxicidad de los Nanogeles cargados con 5-FU y CUR por el método de MTT y compararla con 5-FU y CUR libres.

CAPÍTULO II. TEORIA GENERAL

Generalidades del cáncer

El cáncer se define como un trastorno donde los mecanismos de proliferación y muerte celular se encuentran alterados. Los cambios genéticos inducen el crecimiento constante de la célula anormal, anulando la muerte celular (apoptosis), entre otros mecanismos, lo cual le otorga a la célula dañada una vida prolongada. El crecimiento descontrolado de las células malignas en un tejido específico es llamado tumor maligno y desafortunadamente es una enfermedad muy común en la actualidad. (MEDINA VILLASEÑOR & MARTINEZ MACIAS, 2009).

La enfermedad neoplásica conocida como cáncer es considerada una enfermedad ambiental, con 90-95% de los casos derivados a ella por consecuencia de la exposición directa crónica de contaminantes, consumo de tabaco, dieta baja en nutrientes, sedentarismo, entre otros, y del 5-10% provocados por algún factor genético hereditario. Los cuales suelen implicar la predisposición a crecimiento de tumores específicos y es manifestado por un factor genético mutado.

La presencia de cáncer se puede sospechar sobre la base de los síntomas o los hallazgos en las pruebas de diagnóstico clínico, y este puede derivar de otras enfermedades adyacentes relacionadas. (Agarwal et al., 2011).

Los múltiples mecanismos que se conocen para la transición maligna de una célula implican desde el inicio del ciclo celular, hasta cualquier vía específica de alteración de crecimiento, proliferación y muerte esta la diseminación o metástasis la cual tiene implicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la misma enfermedad.

La metástasis es la invasión de las células malignas a órganos vitales y sitios distantes a partir de un tumor primario, es muy importante mencionar que, en el mayor porcentaje del diagnóstico de cáncer, al presentarse de manera asintomática, al momento de realizar el tratamiento conveniente para el tipo de cáncer es probable que haya migrado a otros órganos vitales, presentándose otra dificultad para la intervención oportuna del cáncer. La serie de pasos para realizar dicha acción es llamada cascada metastásica y es influenciado por factores enzimáticos y señalización celular específica.(Weinberg, 2008).

Otro de los factores importantes a destacar es la modificación del microambiente de las células tumorales, favoreciendo su desplazamiento y aumento de tamaño, donde la matriz extracelular transmite señales intra e intercelulares de una manera anómala las cuales cambian de manera constante el comportamiento del tumor como la alteración de mecanismos de angiogénesis y la resistencia de fármacos citostáticos.(Rol et al., 2022).

Estadísticas actuales del cáncer

El cáncer es un importante problema de salud pública en todo el mundo. En 2020, el diagnóstico y tratamiento del cáncer se vieron afectados negativamente por la pandemia de coronavirus del 2019 (COVID-19). El acceso reducido a la atención médica y el miedo a la exposición al virus resultó en retrasos en el diagnóstico y tratamiento el cual pueden conducir a una disminución a corto plazo en la incidencia de cáncer seguida de un aumento en la enfermedad en etapa avanzada y, en última instancia, aumento de la mortalidad.

Sin embargo, la cuantificación de los datos de vigilancia llevara por lo menos varios años en que la difusión de los mismos llegue. Por ejemplo, actualmente solo se dispone de datos de incidencia y mortalidad por cáncer hasta el año 2018 y 2019, respectivamente, dando datos disponibles más fiables a las cifras estimadas en 2023. (Siegel et al., 2022).

En el año 2020 la Organización Mundial de la Salud reporto 19.3 millones de casos nuevos de cáncer, con un incremento anual del 1.5% y en México esta enfermedad es la tercera causa de muerte en el país.(Vargas-ruiz, 2023).

Entre los tipos de cáncer con mayor incidencia tenemos el cáncer de mama, con 2.26 millones de casos anuales, el cual es el 11.7% del total de casos de cáncer y el 24.5% de casos de cáncer en mujeres, liderando lamentosamente el 15.5% de muertes en mujeres al año.

El cáncer pulmonar continúa estando presente en la mayor parte de las regiones del mundo, teniendo una incidencia anual de 2.21 millones de casos, siendo el 11.4% de los casos de cáncer y con una mortalidad de 1.79 millones de pacientes cada año

ya sea a hombres o mujeres. El cáncer de próstata es el segundo cáncer mas prevalente en hombres y se estima que al año hay 1.41 millones de casos nuevos. El cáncer de piel (7.2%) y estomago (7.1%).(Chhikara & Parang, 2022).

El cáncer colorrectal (CCR) representa más de 1.85 millones de casos anuales (el 9.8% del total de casos de cáncer) y se calcula que tiene una mortalidad de 850.000 al año. En el año 2018, el CCR fue la segunda causa más común de mortalidad por cáncer en México en ambos sexos. Aunque existen diferencias regionales que puede hacer que la carga de cáncer sea respectivamente mayoritaria de un lado a otro, las tasas aun así siguen aumentando de manera alarmante especialmente en las zonas urbanas y debido a que no existen programas u organizaciones para la detección en México, el CCR se diagnostica a menudo en etapas avanzadas. Los servicios sanitarios en México se dividen en varias instituciones que atienden a poblaciones únicas y están estratificadas por situación laboral.

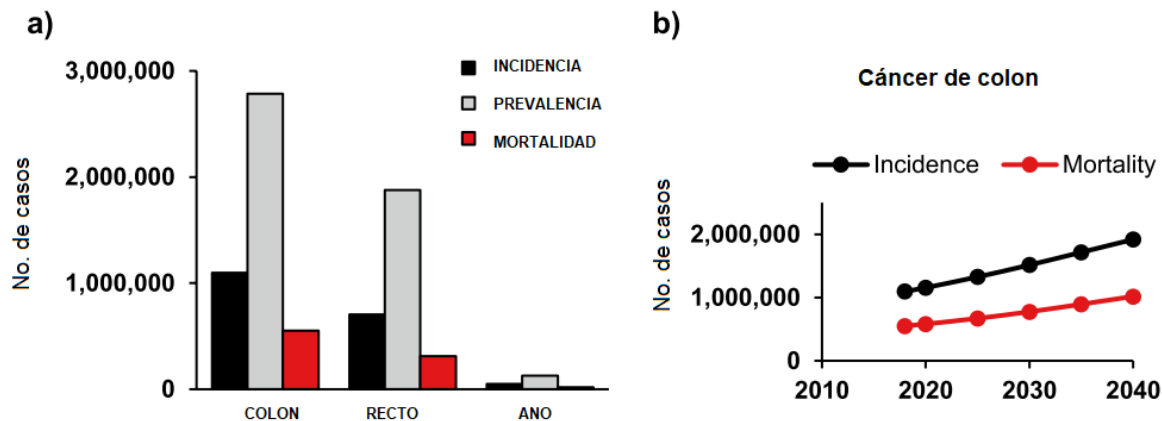


Figura 1. Datos epidemiológicos mundiales (de ambos sexos y de todas las edades) de cáncer de colon, recto y ano. **a** Incidencia, prevalencia y mortalidad estimada hasta 2018. **b** Progresión estimada en términos de incidencia y mortalidad de cáncer de colon de 2018 hasta 2040. Datos disponibles en GLOBOCAN.(Farinha et al., 2021).

Dado a que los programas de salud son variados y su cobertura también, conocer las tendencias según la afiliación de seguro médico es fundamental para

diseñar un programa de tratamiento eficaz en un esfuerzo por comprender la población con más probabilidades de riesgo. (Espinosa-Tamez et al., 2022).

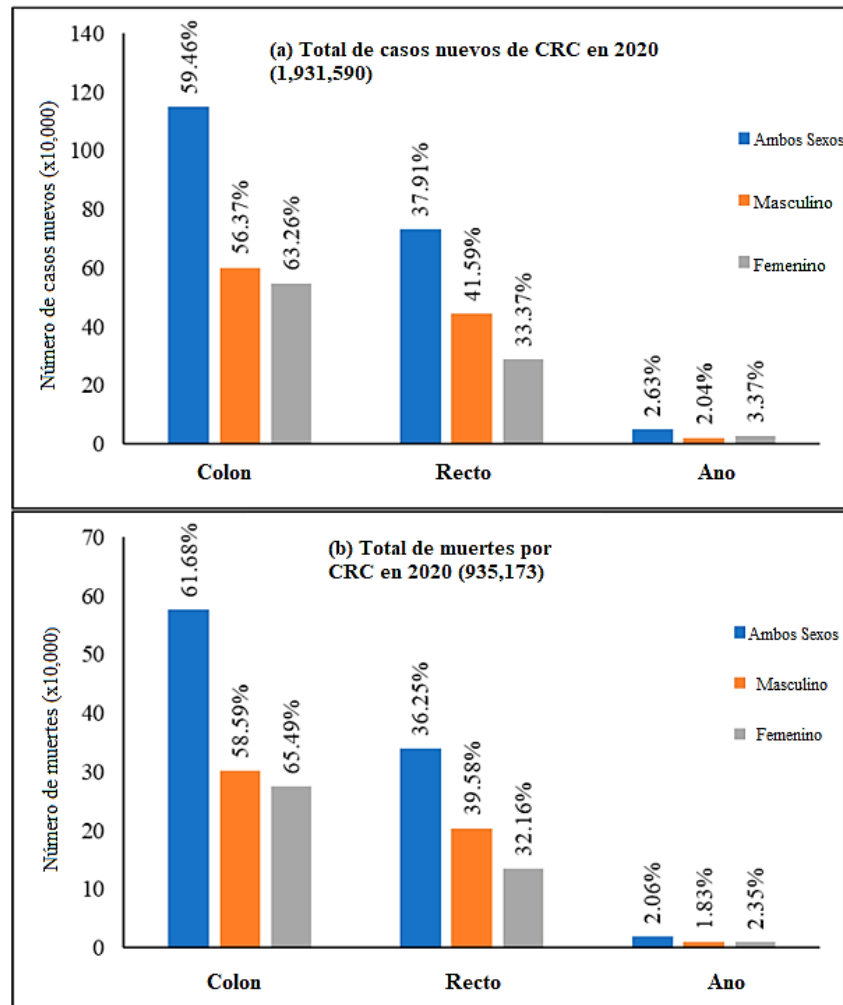


Figura 2. Nuevos casos y muertes por cáncer de colon, recto y ano del 2020.

(a) Nuevos casos y **(b)** Muertes por cáncer de colon, recto y ano. Datos extraídos con permiso de GLOBOCAN. (Hossain et al., 2022).

Cáncer de colon

La etiología del cáncer colorrectal es compleja e involucra varios factores incluyendo los genéticos y ambientales. El cáncer puede ser esporádico o hereditario (familiar) y este a su vez puede ser asociado o no a poliposis (tumoración benigna en colon).

Su patogénesis se asocia con mutaciones secuenciales a lo largo de un periodo de años en las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico, de la proteína tumoral TP53 y del factor beta de crecimiento los cuales son genes supresores de tumor, Una característica común de todos los CCRMSC son las alteraciones de las vías metabólicas que suministran la energía y los nutrientes necesarios para la proliferación. Por ello, uno de los principales focos de investigación en la patogénesis del CCR es comprender los mecanismos de la desregulación del metabolismo del cáncer. Existen pocos síntomas los cuales pueden alertar de la existencia de un cáncer colorrectal, normalmente cuando se manifiestan es porque están alcanzando tamaños considerables y se consideran localmente avanzados.(Sedlak et al., 2023). Algunos de los síntomas para los canceres de colon son sangrado , dolor abdominal, pérdida de peso, anorexia, obstrucción intestinal.

Realizar el diagnóstico de cáncer de colon cuando ya se tiene algunos de los síntomas o signos antes mencionados es fácil, lo importante es encontrar a los grupos de pacientes con factores de riesgo, los cuales presentan alta susceptibilidad, con la finalidad de detectar la enfermedad en etapas tempranas.

La evaluación clínica del paciente incluye desde una historia clínica completa, examen físico, Tomografía por Emisión de Positrones (TEP)(preferencial), Niveles de

antígeno carcinoembrionario y colonoscopia, este último con gran relevancia ya que la intervención puede permitir realizar una biopsia directa de un pólipo y así determinar el tipo de tejido o estadio del cáncer si es que ya se encuentra presente. (Medina-Martinez, 2009).

Una vez que se ha confirmado que la biopsia de los pólipos es cancerosa, se detectara el tipo de célula primaria que se encuentra en el cáncer de colon y así evaluar el estadio en el que se encuentra.

El cáncer colorrectal esta categorizado en los siguientes estadios:

Estadio 0- El cáncer solo se encuentra en el revestimiento mas interno del colon o del recto.

Estadio I- El tumor ha crecido hacia la pared interna del colon o del recto, pero no lo traspasa. El manejo de este tipo de pacientes es hacer una resección quirúrgica llamado polipectomía, después del adecuado procedimiento, no es necesaria la aplicación de tratamiento citostático.

Estadio II- El tumor se extiende en lo más profundo del tejido de la pared del colon o del recto. Las células cancerígenas usualmente invaden los tejidos cercanos, pero no hacia los nódulos linfáticos. El manejo óptimo de pacientes en estadio II es realizar cirugía y después hacer tratamiento con quimioterapia. Hay algunos factores que aumentan el riesgo de recurrencia o fallo de tratamiento como son: perforación del tejido, nivel elevado de antígeno carcinoembrionario y tumores con deleción del cromosoma 18, estos factores acercan a los canceres mas a comportarse como estadio clínico III.

Estadio III- El cáncer se ha diseminado hacia los nodos linfáticos, pero no hacia otras partes del cuerpo. Estos pacientes deben recibir quimioterapia postoperatoria, en régimen de hasta doble o triple esquema de agente citostático.

Estadio IV- El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como puede ser el hígado o los pulmones. Los pacientes con enfermedad metastásica se puede realizar resección quirúrgica y alcanzar ventaja en la sobrevida dependiendo de las lesiones que se encuentren y no dejar ningún tumor residual en ningún otro sitio.

Recurrencia – Este es el cáncer que ha sido tratado, pero ha regresado después de un tiempo el cual no fue detectado. El cáncer puede regresar en el colon, recto, o en otra parte del cuerpo. El manejo de este tipo de pacientes gira alrededor del control de los síntomas, detener el tiempo de progresión y alargar la sobrevida. Los tratamientos paliativos dependerán de cada paciente y debe ser individualizado.(Errnphglfr & Frp, n.d.)(Brier & lia dwi jayanti, 2020).

Metástasis de cáncer de colon.

La mayor parte de los casos de mortalidad por CCR se debe a metástasis, siendo el hígado y los pulmones las localizaciones más frecuentes de aparición.

Las células tumorales metastásicas se adaptan a nuevas condiciones metabólicas durante la invasión, extravasación, circulación, extravasación y el crecimiento en diferentes microambientes. A diferencia de las células cancerígenas del cáncer de colon las células madre cancerosas tienen mayor potencial metastásico y conservan sus características epiteliales, en lugar de adoptar un fenotipo diferente.

Estas células madre cancerosas se caracterizan por tener varios marcadores, entre ellos el receptor de trombopoyetina, CD110, que potencia funcionalmente la metástasis del CCR.

El receptor de trombopoyetina promueve la metástasis hepática del CCR por las células madre cancerosas y la CD110+ mediante la activación de la degradación de la lisina, induciendo un cambio en el estado redox y la activación de la señalización WNT. Dadas las dependencias metabólicas dinámicas del CCR a lo largo de la cascada metastásica, el metabolismo ha sido uno de los principales focos de investigación para comprender los mecanismos de la metástasis del CCR. El desorden del metabolismo de los ácidos grasos, la producción de glutatión y la prostaglandina E2 (PGE2) potencian la capacidad de metástasis de las células del CCR.

Se descubrió que el desorden del metabolismo de los ácidos grasos expande las células madre cancerígenas y promueve las metástasis hepáticas a través de la expresión de la proteína NANOG, un factor de transcripción importante para la autorrenovación de las células madre. Un estudio reciente descubrió que la regulación al alza del metabolismo de los ácidos grasos también puede ayudar a que las células del CCR se vuelvan resistentes a la anoikis, una forma especializada de apoptosis causada por el desprendimiento de la matriz extracelular.

La producción de glutatión parece aumentar de forma similar la capacidad metastásica de las células de CCR. El aumento de glutaminasa 1 (GLS1), una enzima que hidroliza la glutamina en glutamato, se asocia con metástasis. El mecanismo subyacente al aumento de la metástasis del CCR debido a la regulación de GLS1 no se conoce del todo, pero puede estar relacionado con un aumento de la producción de glutatión debido a la mayor disponibilidad de glutamato, uno de los tres aminoácidos que forman el glutatión.

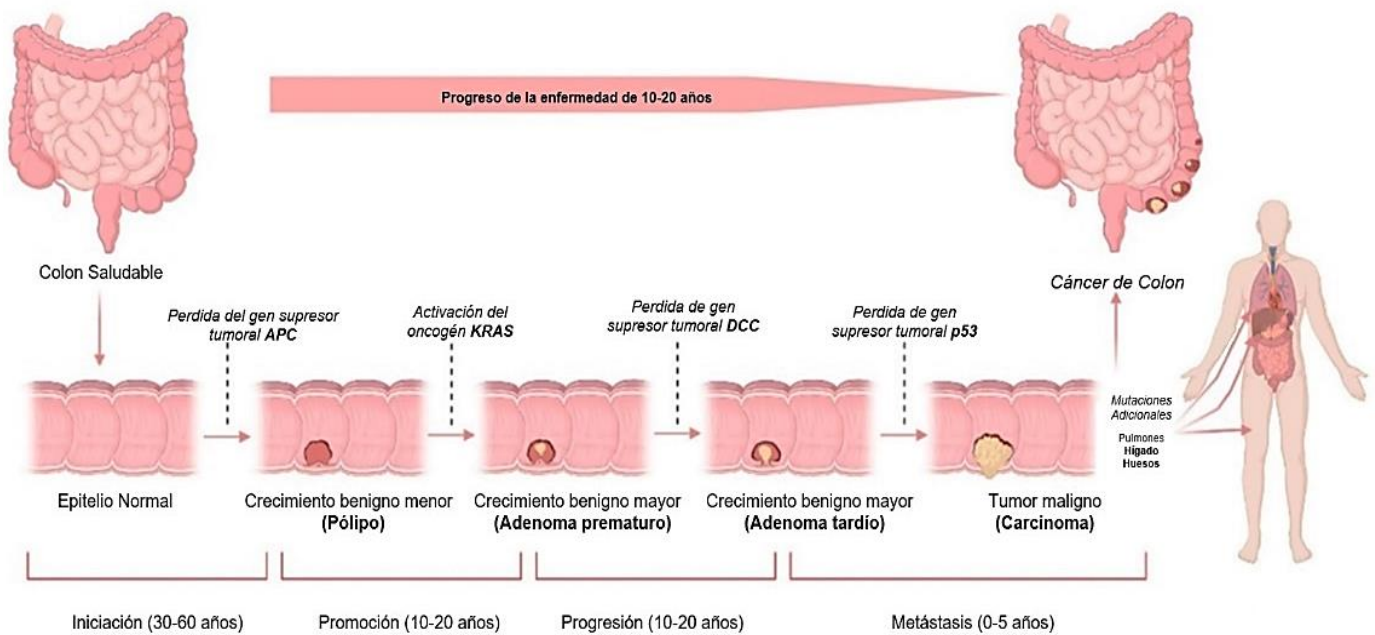


Figura 3. Etapas y desarrollo del cáncer colorrectal. (Hossain et al., 2022)

El aumento de glutatión puede promover un fenotipo de células madre de cáncer de colon a través de la regulación al alza de NANOG y elevar la presencia de metástasis en hígado.

El entorno hipóxico con condiciones difíciles para las células del CCR requieren adaptaciones metabólicas complejas para poder sobrevivir. Para poder obtener energía

para proporcionar a la proliferación en un entorno con poco oxígeno, las células del CCR liberan creatina cinasa de tipo cerebral la cual se convierte en fosfocreatina las cuales puede ser transferida de nuevo a las células del CCR a través del transportador de fosfocreatina, la proteína SLLC6A8, para así generar ATP.

Otra adaptación metabólica que puede ayudar a las células del CCR a sobrevivir en el hígado es la capacidad de sintetizar nucleótidos en condiciones de hipoxia, a través del aumento de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1.(Sedlak et al., 2023).

Por otro lado, ciertas alteraciones de la matriz extracelular como la producción anómala de ácido hialurónico promueven señales celulares anormales que pueden desencadenar una proliferación celular desregulada, la reorganización del citoesqueleto, un aumento en la capacidad de migración celular y la modulación del sistema inmune formando así un microambiente tumoral favorable para el establecimiento, crecimiento y potencial metastásico de las células del CCR.

Además, de las células tumorales que contribuyen al crecimiento del tumor y la metástasis, las células inflamatorias, los fibroblastos estromales, las células perivasculares y otras células estromales asociadas al tumor contribuyen significativamente a la producción de factores pro-angiogénicos los cuales influyen en la diseminación de factores hacia los tejidos cercanos y se unen receptores en las células endoteliales preexistentes, las cuales las activa y secretan diversas enzimas proteolíticas las cuales degradan la membrana basal y la matriz extracelular, permitiendo la proliferación de las células endoteliales activadas.(Rol et al., 2022).

Microambiente tumoral

Las células tumorales modifican su microambiente (MAT) favoreciendo su crecimiento y diseminación, donde la matriz extracelular induce señales intra e intercelulares anormales que modulan el comportamiento tumoral.

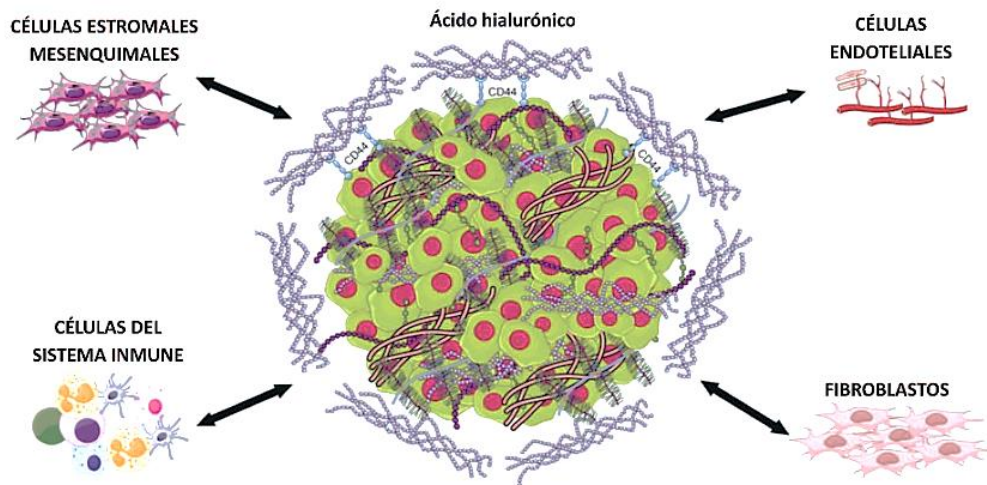


Figura 4. Microambiente tumoral. (Rol et al., 2022).

El MAT está formado por componentes celulares, que son las células asociadas que rodean al tumor y cumplen un rol activo en su establecimiento y diseminación; y a su vez por componentes denominados acelulares, dentro de los que se incluyen factores de crecimiento, citoquinas y otros componentes de la matriz extracelular.

La activación de señales específicas asociadas al crecimiento tumoral son capaces de inducir la reprogramación de las células que están alrededor al tumor en desarrollo, como células endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmune como macrófagos, células NK, linfocitos T, entre otros. Las células del sistema inmune que

son afectadas contribuyen funcionalmente al desarrollo y progresión tumoral principalmente durante el proceso de evasión de la respuesta inmune.

Esto ocurre a través de la liberación de factores solubles como mediadores de respuestas inmunosupresoras que tienen características proangiogénicas como citoquinas y quemoquinas, enzimas degradantes de la matriz extracelular, especies reactivas al oxígeno y otras moléculas bio-activas.

Estas alteraciones que pueden estar en la matriz extracelular promueven señales celulares que pueden desencadenar una proliferación celular desregulada, la reorganización del citoesqueleto, migración celular y modulación del sistema inmune.

Los componentes celulares que ayudan a mantener el microambiente tumoral rodean el tumor. Como las **células endoteliales**, estos componentes necesitan mantener al tumor ya que requiere de una gran cantidad de nutrientes y oxígeno, para esto, se genera una neo-vasculatura asociada al tumor mediante el proceso de angiogénesis tumoral el cual a diferencia de un proceso que ocurre en condiciones fisiológicas, la angiogénesis tumoral se encuentra activa por un tiempo prolongado, provocando la formación de nuevos vasos sanguíneos que también ayudan a mantener el crecimiento del tumor. Este tipo de mecanismos hace que este tipo de células adquieran resistencia a los fármacos, ya que la sobreexpresión de bombas de expulsión de fármacos dependientes de ATP situadas en la membrana plasmáticas, tales como ABCB1.

Para el caso de la **matriz extracelular** tumoral la cual es una red compleja de proteínas fibrosas extracelulares como el colágeno y la elastina, proteoglicanos,

glucosaminoglicanos y glicoproteínas que forman agregados supramoleculares por enlaces intermoleculares entre ellos.

Además de su composición bioquímica, el matiz extracelular tumoral también se caracteriza por parámetros biofísicos característicos, tales como la densidad molecular, rigidez, resistencia y tensión, lo que la vuelve muy versátil y capaz de someterse a cambios constantes como las que suceden durante la progresión tumoral.

Algunos de los componentes de mayor abundancia que se encuentra en la matriz extracelular son los mucopolisacáridos (GAGs), definidos como heteropolisacáridos largos no ramificados, compuestos por disacáridos alternados de ácido uránico y amino azucres. Dentro de esta familia de GAGs, el principal es el ácido hialurónico el cual es un mucopolisacárido lineal no sulfatado formado por disacáridos repetidos de ácido-D- glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos entre si mediante enlaces glicosídicos β . El ácido hialurónico puede existir como un GAG libre o unido de forma no covalente, y se encuentra en la matriz extracelular intersticial y pericelular de la mayoría de los tejidos adultos. Este a su vez contribuye a inducir diferentes señales intra e intercelulares. Ya que este puede interactuar con diferentes receptores de superficie celular (CD44, RHAMM, TLR4, LYVE- 1), con proteínas de unión (HABP, TSG-6) y con otros proteoglicanos.

Estas interacciones permiten al ácido hialurónico modular distintos procesos celulares entre los que se incluyen el crecimiento, la adhesión, la migración y la diferenciación celular, así como también el cierre de heridas, debido a ese proceso y a la actividad inmunomoduladora significativa contribuye a la supervivencia y progresión

maligna de las células tumorales, resistencia a la apoptosis y a multidroga, la invasión y la metástasis.(Rol et al., 2022).

Participación de glutatión en el cáncer

El glutatión o GSH (L- γ -glutamil-cisteinil-glicina) es un tiol intracelular se encuentra tanto en células eucariotas como procariotas e interviene en la regulación de numerosas rutas metabólicas, muchas de las cuales se deben a su estructura química. El grupo tiol (-SH) de la cisteína es el que interviene en las reacciones redox, mientras que el enlace γ -glutamilo entre la glutamina y la cisteína le hace resistente a la degradación por peptidasas celulares. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) localizada en la membrana celular. Interviene en la síntesis del ADN, en este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos, una reacción catalizada por el ribonucleótido reductasa. También se encuentra implicado en el proceso de la modulación de la respuesta inmune, pudiendo aumentar la perceptibilidad celular, activación del mismo, proliferación y diferenciación de linfocitos T.

En condiciones fisiológicas normales, la mayor parte del GSH intracelular se encuentra en su forma reducida (0.5 a 10mM dependiendo del tipo celular) y tiene una distribución intracelular variada, mientras que su concentración extracelular es relativamente baja (2 a 20 μ M).

El 85-90% del GSH se distribuye libremente en el citosol, pero también puede encontrarse en diversos orgánulos, incluyendo las mitocondrias, los peroxisomas, la matriz nuclear, y el retículo endoplasmático.

El metabolismo de glutatión con respecto al cáncer es capaz de desempeñar tanto un papel protector como patogénico. Su papel en la eliminación y la detoxificación de sustancias cancerígenas es fundamental y la alteración de sus niveles puede afectar a la supervivencia celular. Sin embargo, por su papel protector celular frente al daño inducido por radicales libres, confiere resistencia a las células tumorales frente a las radiaciones ionizantes y a los fármacos quimioterapéuticos; de este modo, niveles elevados de glutatión en las células tumorales son capaces de protegerlas en diversos tipos de cáncer, como cáncer de médula ósea, mama, colon, laringe y pulmón. (Sánchez, 2014).

Tratamiento contra el cáncer de colon.

La cirugía es el tratamiento primario para el cáncer colorrectal que no se ha extendido a otras partes distantes del cuerpo generalmente en los estadios I-III. Si se ha decidido dar terapia de seguimiento con quimioterapia adyuvante dependerá del estadio de la enfermedad y del riesgo de diseminación.

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado varios agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer de colon, son fármacos que impiden la rápida división celular de las células cancerosas interfiriendo así en el proceso general de división celular tanto de las células cancerosas como de las células normales.

Tabla 1. Fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer de colon aprobados por la FDA.

Nombre Genérico	Año de aprobación por la FDA	Método de acción del fármaco	Liberación	Consideraciones
5-Fluorouracilo (5-FU)	1991	Antimetabolito que ataca directamente a puntos específicos de la división celular.	Infusión intravenosa	Parte de la mayoría de los tratamientos.
Irinotecan	2000	Molécula pequeña que previene el procesamiento del ADN.	Infusión intravenosa, combinada con 5-FU	
Capecitabina	2001	Molécula pequeña que ataca puntos específicos del ciclo de la división	Vía Oral	

		celular.		
Oxaliplatino	2002	Molécula pequeña que ataca el ciclo celular durante la interfase.	infusión intravenosa combinada con 5-FU	

Nombre Genérico	Año de aprobación por la FDA	Método de acción del fármaco	Liberación	Consideraciones
Cetuximab	2004	Anticuerpo monoclonal que se une al EGFR Y previene la división celular.	Infusión intravenosa	El 40% de los cánceres CCR tienen genes defectuosos que hace que el fármaco sea poco eficiente, los

				pacientes deben de hacerse análisis antes de su administración.
Panitumumab	2006	Anticuerpo monoclonal que se une al EGFR Y previene la división celular.	Infusión intravenosa	El 40% de los cánceres CCR tienen genes defectuosos que hace que el fármaco sea poco eficiente, los pacientes deben de hacerse análisis antes de su administración.
Regorafenib	2012	Molécula pequeña que ataca puntos específicos de los receptores-2 de VEGF y	Vía Oral	Es severamente tóxico para el hígado, los pacientes deben ser monitoreados regularmente.

		tirosina quinasa para prevenir la angiogénesis.		
Bevacizumab	2013	Anticuerpo monoclonal que tiene como objetivo VEGF y prevenir la angiogénesis	infusión intravenosa combinada con 5-FU	Efectos adversos severos.

La FDA aprobó fármacos los cuales inhiben puntos moleculares específicos implicados en vías de señalización celular anómalas las cuales regulan el desarrollo y el comportamiento de las células. Entre los lugares específicos destacados de las terapias contra el CCR figuran las proteínas receptoras del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), así como sus vías correlacionadas.

El tratamiento contra el CCR depende del estadio donde se encuentre, regularmente en **etapas 0 y I** del CCR no requiere tratamiento de quimioterapia de seguimiento como se había mencionado, después de la resección quirúrgica del pólipo con tejido canceroso, el paciente se deberá de someter a observación para verificar que no haya una recurrencia.

El tratamiento en **etapa II** depende de cómo el paciente es catalogado, si es de alto riesgo o de menor riesgo de recurrencia de la enfermedad.

Los factores de riesgo alto a considerar son las siguientes:

- El cirujano solo puede remover hasta 12 nódulos linfáticos durante la resección quirúrgica.
- El cáncer ha infectado órganos cercanos.
- El cáncer ha obstruido el intestino o el colon.
- El cáncer ha perforado la pared del colon.
- El cáncer ha sido encontrado cerca de una resección quirúrgica anterior, lo cual indica que algún residuo del tumor se ha quedado en el tejido.

Algunas opciones de tratamiento para pacientes con riesgo alto y bajo son los siguientes:

- Observación sin terapia de seguimiento
- Terapia de seguimiento con fármacos quimioterapéuticos como la combinación de 5-FU con otros fármacos.

Según los expertos, la definición para distinguir entre paciente de alto y bajo riesgo es inadecuada ya que hay datos concretos que indican claramente las características clínicas que predicen el beneficio del tratamiento de seguimiento. Los expertos coinciden en que es razonable aceptar el beneficio relativo de esta terapia sin embargo tras la cirugía es la manera en la cual se determina el riesgo.

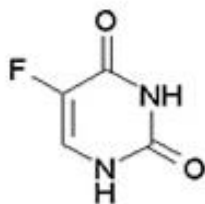


Figura 5. Molécula de 5- Fluorouracilo.(Tummala et al., 2015)

El tratamiento estandarizado en etapas **III Y IV** es la resección quirúrgica y por consiguiente tratamiento quimioterapéutico de seguimiento, es recomendable aplicar 6 meses de tratamiento quimioterapéutico después de la primera resección quirúrgica. En el caso de la etapa IV donde ya se puede presentar metástasis en órganos y tejidos distantes, es recomendable administrar terapias quimioterapéuticas de seguimiento, dirigidas y manejo de sintomatología.

Las terapias citostáticas de seguimiento usualmente son las siguientes:

- 5-Fluorouracilo, Acido folínico
- Ácido folínico, 5-FU, Oxaliplatino
- Ácido folínico, 5-FU e Irinotecan
- Capecitabina y oxaliplatino
- Ácido folínico, 5-FU, oxaliplatino e irinotecan

El ácido folínico ayuda a proteger a las células sanas del efecto del tratamiento citotóxico de las terapias. (Brier & lia dwi jayanti, 2020).(Sedlak et al., 2023).

Terapias alternativas contra el cáncer de colon.

Tener como objetivo primordial a los procesos metabólicos que se requieren para tratar adecuadamente el CCR sin sobrepasar el límite toxico en tejidos normales es de algún modo la manera de abordar el mejor tratamiento individualizado dependiendo del tipo de paciente. Sin embargo, los tratamientos farmacológicos aprobados son muy tóxicos, en algunos eventos los fármacos citotóxicos son tan perjudiciales que el paciente tiene que abandonar la terapia, teniendo como consecuencia una respuesta celular más agresiva a la que se había tenido anteriormente.

Recientemente, el número de nuevos fármacos para el tratamiento del CCR, como la metformina, que usualmente es utilizada en el tratamiento de Diabetes tipo 2, con la combinación de un fármaco citotóxico, inhibe significativamente el crecimiento del tumor y las citoquinas pro y antiinflamatorias. Se han realizado terapias combinadas con 5-FU en etapas avanzadas de CCR, reduciendo el número de tumores en el colon a través de la inducción a la apoptosis y disminuyendo los niveles de proteínas relacionadas formación de tumores como IL-10, TGF- β , IL-17A, SNAIL y traslocaciones de β -catenina al núcleo.(Sedlak et al., 2023).

La Curcumina, que es el activo de *Cúrcuma longa*, una especia nativa de la India que ha sido utilizada por sus propiedades farmacológicas teniendo potencial para inhibir la supervivencia del cáncer, recientemente ha recibido mucha atención ya que la activación del factor necrótico del tumor (TNF) inducido por el factor nuclear κ B (NF- κ B), junto o combinado con otros agentes citotóxicos puede ser de ayuda a contrarrestar la sintomatología de la quimioterapia y también puede modular la proliferación celular. Sin embargo, su biodisponibilidad es muy baja, tiene poca solubilidad en agua, baja absorción y excreción muy rápida, limitando así el potencial clínico que proporciona la Curcumina.(Wong et al., 2019).

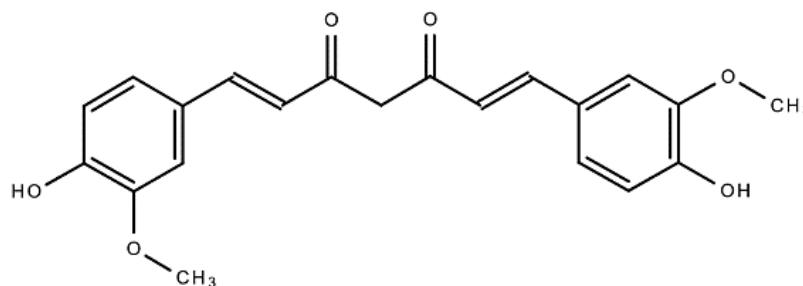


Figura 6. Estructura química de la Curcumina.(Kabir et al., 2021)

Las dosis altas que se deben de utilizar al día por vía oral a seres humanos que son 8 g de Curcumina solo dieron a lugar una concentración sérica máxima media de 1,77 μ M de Curcumina. Gracias al desarrollo de diferentes formulaciones basados en nanotecnología se espera mejorar la solubilidad acuosa de la Curcumina y la administración del fármaco en el lugar donde se encuentra afectado por el CCR.(Manzanares-guevara et al., 2020).

El principal mecanismo de la Curcumina sobre las células cancerígenas, es inducir la apoptosis de dichas células. Cabe destacar que, hasta la fecha, la Curcumina ha demostrado ser eficaz en la supresión de varias fases del desarrollo del CCR, y su eficacia terapéutica se ha visto reforzada por el uso de la Curcumina en el tratamiento del CCR.

La relación estructura- actividad viene determinada por el hecho de que la Curcumina se pliega de tal manera que los grupos funcionales son capaces de interactuar con el centro activo de la tiorredoxina e inhabilitar la enzima Cys496/Sec497. Como la actividad anticancerosa de la Curcumina está limitada por su pobre absorción, se han hecho muchos esfuerzos por mejorarla.(González-Albadalejo et al., 2015).

Otra terapia alternativa al tratamiento convencional de CCR es la terapia de bloqueo metabólico o autofagia, el cual reduce el exceso de radicales libres producidos durante las respuestas inflamatorias, aumenta la defensa antibacteriana y disminuye la permeabilidad del tejido epitelial intestinal, sin embargo estos mecanismos aún deben ser revisados ampliamente.(Andrade-Meza et al., 2023).

La terapia inmunológica es considerada ya una terapia coadyuvante de la terapia convencional, la estrategia de la terapia es estimular la respuesta inmune para eliminar las células tumorales. El sistema inmunitario vigila activamente las células del organismo para detectar y destruir las células extrañas. Las células se identifican como extrañas o no extrañas en función de las moléculas expresadas en su superficie, denominadas antígenos. En el contexto de las células tumorales, el sistema inmunitario puede identificar y eliminar de forma natural algunas de estas células basándose en la expresión de antígenos; sin embargo, los tumores son tan sofisticados que pueden cambiar la expresión de algunos de sus antígenos de superficie para parecerse a células normales. Este proceso suele denominarse edición inmunológica. Las células T son las principales células del sistema inmunitario. Estas atacan directamente a las células cancerosas mediante el envío de señales, las células T auxiliares atacan directamente a las células infectadas. Este tratamiento puede incluir vacunas contra el CCR, transferencia de células modificadas, inhibidores de puntos de control inmunitario, anticuerpos monoclonales y terapias combinadas.

Las vacunas contra el cáncer son enfoques inmunoterapéuticos activos que pretenden activar y expandir las células T específicas del tumor para inducir una respuesta antitumoral. Las vacunas inmunoterapéuticas activas contra el cáncer se componen de antígenos tumorales, que son moléculas proteicas expresadas en la superficie de las células tumorales. Los antígenos del CCR que se han utilizado en el desarrollo de vacunas incluyen CEA, CD55, Ras mutante y p53, entre otros.

Se han desarrollado diversas metodologías y mecanismos de administración para las vacunas contra el cáncer, como los enfoques basados en proteínas, las

células dendríticas, el ADN recombinante (a menudo virus oncolíticos o bacterias utilizadas individualmente o en combinación con células dendríticas) y la terapia de células completas.(Brier & lia dwi jayanti, 2020).

Sistema de liberación de fármacos.

Optimizar la liberación del compuesto terapéutico al objetivo es un problema importante en el tratamiento de muchas enfermedades no solo del CCR. La aplicación convencional de fármacos se caracteriza por una eficacia limitada, una biodistribución deficiente y la falta de selectividad. Estas limitaciones pueden superarse controlando la administración y la liberación de los fármacos.

Es los sistemas de liberación controlada de fármacos, el fármaco se transporta al lugar de acción, por lo que se puede minimizar su influencia en los tejidos vitales y los efectos secundarios indeseables. Además, los sistemas de liberación protegen al fármaco de una rápida degradación o eliminación, por lo cual requieren dosis más bajas.

Esta forma moderna de terapia es especialmente a los recientes avances en nanotecnología que han demostrado que las nanopartículas (estructuras de entre 1-200 nm en al menos una dimensión) tienen un gran potencial como transportadores de fármacos.(Wilczewska et al., 2012).

Así mismo, las características fisiológicas específicas del microentorno tumoral pueden utilizarse para diseñar sistemas de administración de fármacos que respondan a los estímulos con el fin de lograr el objetivo de la terapia dirigida.(Li et al., 2021).

Nanogeles

Los Nanogeles (NG) pueden definirse como hidrogeles de tamaño submicrométrico, formados por cadenas poliméricas reticuladas física o químicamente que dan lugar a una red porosa tridimensional (3D) con la habilidad de tener una gran capacidad para absorber agua, sin llegar a disolverse.

Normalmente, se caracterizan por su forma esférica, pero pueden adoptar otras formas físicas dependiendo de los métodos de síntesis que se utiliza.

Por ejemplo, las técnicas de micro moldeo y la fotolitografía permiten controlar el tamaño y la forma de los Nanogeles modulando la energía superficial y las interacciones químicas entre los polímeros y la técnica como la polimerización en emulsión puede otorgarle al NG propiedades multirrespuesta ambiental.

Los NG pueden diseñarse con una estructura reticulada o no lo cual es similar a una esfera. La característica distintiva de estos nanomateriales es su comportamiento de hinchamiento.

Los polímeros utilizados en la síntesis de los NG absorben agua, lo que confiere un carácter principalmente hidrófilo, capaz de incorporar una gran cantidad de agua, esta capacidad puede atribuirse a la existencia de grupos funcionales, como -OH, -CONH-, -CONH₂- y -SO₃H, etc., manteniendo su integridad estructural física. El fenómeno está protagonizado por el contacto entre el nano armazón y las moléculas de disolvente: estas últimas interactúan con la superficie polimérica mediante interacciones, que penetran en la red. Las cadenas poliméricas comienzan a alargarse, expandiendo la nanoestructura, hasta que la fuerza elástica retroactiva contrarresta la deformación del sistema.

La condición resultante es un equilibrio de estiramiento-encogimiento, que permite a las NG absorber más del 90% p/p de solución acuosa. La capacidad de retener agua mejora la difusión y el intercambio de iones, metabolitos y biomoléculas hacia y desde los compartimentos biológicos (es decir, fluidos tisulares y órganos), con el fin de mantener el equilibrio biológico-químico con el entorno circundante, esto demuestra una buena sinergia entre los NG y las aplicaciones biológicas lo que los convierte en un sistema de liberación de fármacos inteligente biocompatible muy prometedor.

Además, el hinchamiento de los NG puede diseñarse para que sea sensible a estímulos externos, como las variaciones de pH y temperatura, la fuerza iónica y la afinidad por los disolventes: esto ayuda a ajustar la porosidad, la rigidez y el tamaño de los NG, con el fin de lograr una respuesta controlada y en etapas específicas en el lugar de destino de liberación.

Por lo tanto en la administración de fármacos, los NG no solo protegen la carga del activo de la degradación no deseada y la liberación a un corto plazo de tiempo, sino que también participan activamente en el proceso de administración.(Mauri et al., 2021).

Los NG son las sustancias preferidas para la medicina a base de productos naturales por su estabilidad y rápida respuesta a los estímulos externos. Los NG pueden facilitar la penetración de los productos a base de plantas en las células en mayor medida que los existentes y, por lo tanto, resultan ser una nueva dimensión para la administración oral y transdérmica de fármacos para varias enfermedades no solo para el cáncer.(Iyer & Das, 2021).

Polimerización en emulsión.

Al momento de la síntesis de los NG se debe de tener en cuenta una serie de criterios de estos nanomateriales como lo son: alta biocompatibilidad, alta biodegradabilidad, estabilidad coloidal, alta área superficial, alta capacidad de carga que garantice una liberación sostenida y selectiva del fármaco, y liberación activa/pasiva del fármaco gracias al tamaño de partícula y a las propiedades superficiales.

Otras características que pueden ajustarse controlando cuidadosamente las rutas de la síntesis de los NG's son: liberación de compuestos bioactivos tanto hidrosolubles como oleo solubles, versatilidad en la vía de administración, baja inmunogenicidad y eliminación reducida de NG por el sistema fagocítico mononuclear.

La polimerización basada en emulsión funciona mediante la formación de gotas mono dispersas cinéticamente estables en una fase continua. El fundamento de este proceso es mantener la polimerización en un espacio confinado (las gotas), La dispersión de gotas orgánicas que contienen los monómeros/polímeros reactivos en una solución acuosa (emulsión aceite-en-agua, O/W) suele indicarse como polimerización por emulsión directa; mientras que las gotas acuosas dispersas en un medio orgánico (emulsión agua-en-aceite, W/O) se conoce como polimerización por emulsificación inversa. La formulación NG implica el uso de monómeros, iniciadores, catalizadores y agentes reticulantes.

Generalmente, el proceso se produce en tres pasos: nucleación, crecimiento de nanopartículas precursoras y polimerización.

En el proceso se pueden disolver diferentes monómeros en las fases dispersa y continua, respectivamente. Un catalizador y un reticulante son componentes típicos de

las gotas, mientras que un iniciador se añade a la fase continua. En este caso, suelen elegirse iniciadores. Los primeros radicales resultantes reaccionan con los monómeros generando radicales monómeros que entran en las gotas por difusión para reaccionar con los demás componentes y formar la nanorred.

La nano emulsión resultante tiene una elevada área superficial y permite que los componentes activos penetren fácil y rápidamente en la fase dispersa. La concentración de tensioactivo también puede afectar a la reacción de polimerización: cuando supera la concentración micelar crítica (CMC), la disposición del tensioactivo en la interfase orgánico-agua da lugar a la formación de micelas que encapsulan monómeros.

La consiguiente adición del iniciador a la emulsión da lugar al proceso de polimerización sólo después de difundirse dentro de las micelas, que actúan por tanto como nano reactores. Sin embargo, las limitaciones de este método están relacionadas con la elevada cantidad de tensioactivo necesaria y con las dificultades para lograr la purificación completa de los NG obtenidos.(Mauri et al., 2021).

Nanogeles sensibles a estímulos ambientales específicos.

Los Nanogeles sensibles a estímulos han recibido mucha atención a la administración selectiva de fármacos, especialmente en un microentorno tumoral. El microentorno tumoral presenta condiciones inusuales, como pH elevado, temperatura y concentración de GSH (glutati6n), que son aprovechadas por estos Nanogeles para dirigirlos eficazmente y descargar el fármaco anticancerígeno sin causar ning6n da6o a los tejidos sanos.

Los Nanogeles que responden a estímulos como el del microambiente tumoral, el cual muestra un mayor nivel de actividad en la ruta metabólica de glucólisis y por lo tanto tienen un pH más bajo, en torno a 6,8, en comparación con los tejidos sanos, cuyo pH es de 7,4.

Esta propiedad puede aprovecharse para liberar fármacos a través de diversos enfoques para un tratamiento anticanceroso exitoso. Los Nanogeles diseñados con cadenas poliméricas formadas por grupos ionizables son apropiados para la liberación controlada por pH. También se ha documentado la eficacia de los Nanogeles sensibles al pH en la penetración tumoral profunda.

Los Nanogeles que son sensibles a la respuesta de microambiente tumoral oxido-reducción el glutatión es utilizado como el estímulo interno ideal para esta desestabilización rápida de nano transportadores dentro de las células, para así liberar eficazmente los fármacos.

Los Nanogeles que responden a la estimulación redox suelen contener enlaces cruzados formados por enlaces disulfuro, y han recibido una atención considerable debido a las altas concentraciones de agentes reductores como la tiorredoxina, el glutatión reducido (GSH) y la peroxiredoxina en el interior de las células, en comparación con su concentración en el entorno extracelular. Aproximadamente 2- 10 mM) que los fluidos extracelulares (aproximadamente 2-20 μ M).

La mayor concentración de glutatión en las células cancerosas, en comparación con las sanas, se ha explotado ampliamente como estrategia terapéutica para Más recientemente, los investigadores han preparado Nanogeles que responden a más de un tipo de estímulo.

Los Nanogeles multirrespuesta pueden mostrar una mayor sensibilidad y especificidad para atacar tumores, en comparación con los Nanogeles que responden a un solo estímulo. Estos Nanogeles pueden liberar sus cargas, cambiando su configuración, dimensiones y propiedades químicas o físicas en respuesta a una combinación de estímulos de pH, temperatura, redox y luz.

Los NG en presencia de GSH y a un pH más bajo, la tasa de liberación aumenta debido a la ruptura simultánea de los enlaces disulfuro y protonación de los grupos amino.(Iyer & Das, 2021).(Hajebi et al., 2019).(Cheng et al., 2011).

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiales y reactivos

Ácido 8-aminooctanoico (Sigma-Aldrich Inc.)

Ácido 11-undecanóico (Sigma-Aldrich Inc.)

Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich Inc.)

Tetrahidrofurano (Spectrum)

Cloruro de metacrililo (Sigma-Aldrich Inc.)

Ácido clorhídrico (J.T. Baker)

Éter etílico (Fermont)

Sulfato de magnesio anhidro (Spectrum)

Hidróxido de potasio (Spectrum)

Acetato de etilo (Mallinckrodt)

Hexano

Persulfato de amonio (APS)

Dodecilbenceno sulfonato de sodio (DBS) (Sigma-Aldrich)

5-Fluorouracilo (99% TLC, Sigma-Aldrich)

Curcumina (Sigma-Aldrich)

Gas nitrógeno

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

Buffers de 1.2, 6.8 y 7.4

Agua destilada

Alcohol etílico de 96°

Pinzas de diálisis

Aro metálico

Soporte universal con pinzas

Matraz bola

Parrillas con agitación

Agitador magnético

Termómetro

Balanza analítica

Charolas para pesar

Jeringas para gas

Embudo de separación de 250 ml

Vasos de precipitados de 10 y 100 ml

Probeta de 100 ml

Baño de aceite

Viales color ámbar

Pipetas transfer

Papel Parafilm

Matraces volumétricos de 10 ml

Viales color ámbar

Pipetas transfer

Papel Parafilm

Espátulas

Tubos cónicos Falcon de 50 ml

Micropipetas de 20 μ l, 100 μ l y 1000 μ l

Cubetillas para DLS

Celdas de Potencial Z

Celdas para UV-visible

III. 1.2 Equipos

Dispersión de luz dinámica (DLS) Zetasizer Nano-Zs series, de marca Malvern Instruments, modelos ZEN3500 con láser verde de 532 nm

Potenciómetro

Espectrofotómetro ultravioleta-visible UV-VS spectrophotometer Beckman Coulter DU520 con un dual cell peltrier accesory

Sistema liofilizador equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 ciclos;

Ultracentrífuga modelo VWR Clinical 50 (Beckman coulter)

Balanza analítica (Pioneer, OHAUS) para pesar muestras o reactivos

Baño de control de temperaturas de la marca VWR International Shel Lab modelo 1217

Equipo de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, modelo JSM7800 F Prime

III.2 Métodos

III.2.1 Síntesis monómeros carboxialquilmecrilamidas

La síntesis del monómero se lleva a cabo por el método de Schotten-Baumann, referido a la formación de amidas por acrilación de aminas primarias.

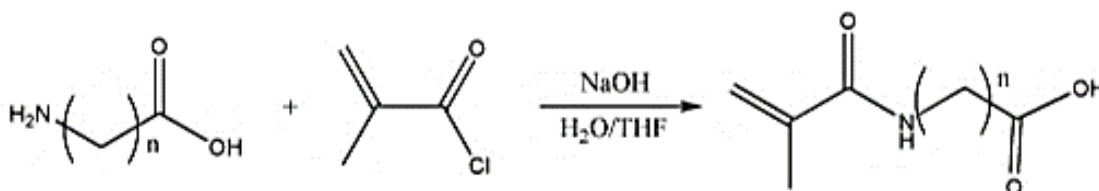


Figura 7. Síntesis para la obtención de carboxialquilmecrilamidas.

La reacción se llevó a cabo a partir del cloruro de metacrililo y dos ω -Aminoácidos, con diferentes números de metilenos en su cadena lateral.

- NMAOc, sintetizado a partir del ácido 8-aminooctanoico ($n=7$) (CAM7)
- NMAUn, sintetizado a partir del ácido 11-undecanóico ($n=10$) (CAM10)

La síntesis de los monómeros se llevó a cabo de la misma manera para los dos diferentes n -aminoácidos, descritos a continuación:

En un matraz bola de 250 ml se disuelven 5 gramos de ácido 11-undecanóico/8-aminooctanoico (24.8 mmol), en una disolución acuosa de NaOH (1N) /THF 20% v/v. La mezcla se colocó en un baño frío a 0°C y se mantuvo en agitación constante. Enseguida, Se adicionó lentamente, con ayuda de una bomba de adición, 3.9 gramos de Cloruro de metacrililo (37.3 mmol), con un tiempo de adición de 3 horas; Después de terminada la adición, se continua en agitación constante por 24 Horas, a

temperatura ambiente. Al terminar la agitación, la mezcla se filtra al vacío para eliminar cualquier residuo o impureza, y se acidifica con HCl (2N) hasta llegar a un pH de 3, conservando la mezcla a 0° C y en agitación constante.

El contenido se extrae con éter etílico, la fase orgánica obtenida se lava con HCl diluido y agua destilada. Posteriormente, se seca con MgSO₄ anhidrido, y se filtra al vacío. Se continúa con tres lavados con hexano de 30 min, y finalmente se vuelve a filtrar a vacío para dejar precipitar el monómero y proceder con la caracterización.(Ciencias & Becerra, 2017).

III. 2.2 Caracterización de los monómeros carboxialquilmetacrilamidas.

III.2.2.1 Espectrofotometría de infrarrojo.

El infrarrojo fue realizado con el equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), por método Directo a temperatura ambiente, usando el software OMNIC 09/02/41.

III.2.3 Síntesis de Nanogeles de CAM10/BAAC Y CAM7/BAAC mediante el método de polimerización en emulsión.

Para sintetizar los Nanogeles de CAM7 y CAM10, se utilizará el método de polimerización en emulsión utilizando N,N'-bis (acriloil) cistamina (BAAC) como entrecruzante y dodecilsulfonato de sodio (DBS) como tensoactivo.

El monómero (ya sea CAM7 o CAM10), el BAAC y el DBS se disuelven en 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente para formar una solución acuosa al 1%

w/v. Una vez obtenida la solución acuosa, se elimina el oxígeno disuelto en la mezcla mediante atmósfera de nitrógeno con burbujeó durante 30 min.

La mezcla de reactivos se calienta a 75°C en un baño de aceite lubricante y se agita de manera vigorosa y constante.

Posteriormente, se añade una solución acuosa de persulfato de amonio (APS al 2%) al sistema para actuar como un iniciador térmico. Se deja que la reacción de polimerización continúe durante 4 horas. Las nano partículas obtenidas se purifican mediante diálisis con agua destilada a temperatura ambiente mediante el uso de una membrana de diálisis (corte de peso molecular = 14.000) por 48 horas con cambio de agua cada 6 horas para purificar el producto.(Serrano-Medina et al., 2012).

Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de los Nanogeles CAM10/BAAC y sus cantidades reacción 1.

Reacción 1	Reactivo	Cantidades
Monómero	CAM10 1%	0.5 g (37.12 mmol)
Entrecruzante	BAAC 5%	24 mg (1.85 mmol)
Iniciador	APS 2%	0.01186 mol
Tensoactivo	DBS	50 mg (3.43 mmol)

Tabla 3. Reactivos utilizados para la síntesis de los Nanogeles CAM7/BAAC y sus cantidades reacción 2.

Reacción 2	Reactivo	Cantidades
Monómero	CAM7 1%	0.5 g
Entrecruzante	BAAC 5%	24 mg (1.85 mmol)
Iniciador	APS 2%	8.44 mg (0.74 mmol)
Tensoactivo	DBS	50 mg (3.43 mmol)

III.2.4 Técnicas de caracterización para los Nanogeles sintetizados.

a) Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Se utilizará el equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) ZetaSizer NS con la finalidad de caracterizar el tamaño de los Nanogeles de las emulsiones obtenidas. Se diluyen 100 μ L de la emulsión previamente purificada aforando a un volumen de 10 mL de agua destilada y en buffer de fosfatos pH 1.2, 6.8 y 7.4 (previamente filtrados), se procede a correr la muestra en el equipo ZetaSizer NS a 25°C, obteniéndose el % en volumen del diámetro hidrodinámico de las nano partículas.

b) Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Para caracterizar la morfología de los Nanogeles sintetizados se procede a observarlos por FESEM (Instituto Tecnológico de Tijuana). En una rejilla de cobre recubierta de carbón se coloca una gotita de una dispersión al 0.4% de Nanogeles teñidos con una gota de acetato de uranilo al 1%.(Serrano-Medina et al., 2012)

III.2.5 Estabilidad coloidal de los Nanogeles.

Se realizarán estudios de estabilidad coloidal al proceso de liofilizado, de reconstitución y de almacenamiento a todos los Nanogeles sintetizados, con la finalidad de aplicarlos a la parte experimental de cargado y liberación de fármacos, analizando las modificaciones y/o la estabilidad en su morfología, su estructura y su radio hidrodinámico.

a) Liofilización

Se tomarán 50 mL de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas en viales cónicos de polipropileno de 50 ml (Falcón), Las muestras se congelan en un congelador convencional por 48 horas, posterior a la congelación se colocan en vasos de vidrio para liofilizar (LabConco), se conectan al liofilizador por 48 horas para obtener las muestras completamente secas. Las muestras se deben observar como un polvo blanco esponjoso.

b) Reconstitución.

Para reconstituir el material, en un vial de vidrio, se adicionaron 10 mg del polvo liofilizado en 5 mL de agua destilada y filtrada bajo agitación constante por 48 horas. Obteniendo los Nanogeles reconstituidos, se tomarán 100 μ L y se diluyen en 10 mL de agua destilada y en buffer de fosfatos pH 1.2, 6.8 y 7.4 (previamente filtrados), se procede a correr la muestra en el equipo ZetaSizer NS a 25°C, obteniéndose el % en volumen del diámetro hidrodinámico de las nano partículas.

III.2.6 Estudios de degradación de los Nanogeles sintetizados en medio redox.

La degradación de Nanogeles reticulados con BAAC será evaluada por DLS midiendo los cambios de tamaño de Nanogeles en respuesta a diferentes concentraciones de glutatión (GSH) (6,8 y 10 mM) en una dispersión de 1.0 mg/mL de Nanogeles y se le adiciono a cada muestra 0.5 ml de Tween 80 (5% con respecto al buffer), preparado en medio acuoso a pH 1.2,6.8 y 7.4 a 37 ° C. Las muestras se agitan a 250 rpm durante 60 min, y los cambios de tamaño de los Nanogeles reticulados con BAAC se miden mediante DLS cada 15 min. Se obtendrá la concentración molar de GSH en la cual se demuestre la degradación de los Nanogeles para aplicaciones posteriores en el estudio de liberación *in vitro*.

Tabla 4. Concentraciones de Glutatión.

Concentraciones de Glutatión (μM)	Miligramos de Glutatión
0	0
6	18.45
8	24.6
10	30.75

III.2.7 Cargado de los Nanogeles con fármacos.

Para el estudio del cargado de los Nanogeles se desarrollarán dos métodos diferentes dependiendo del fármaco que se va a cargar. Por otra parte, se debe determinar la eficiencia de cargado y la capacidad de cargado mediante la ecuación 1 y ecuación 2:

Capacidad de carga del fármaco:

$$CCF = \left(\frac{MFng}{Mng+MFng} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Eficacia de carga del fármaco:

$$ECF = \left(\frac{MFng}{MF} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

2.7.1 Cargado de los Nanogeles con 5-FU.

Para realizar el cargado de 5-FU, previamente se debe realizar una curva de calibración (ANEXO 3) para la obtención de los cálculos. El primer paso para realizar el cargado de los Nanogeles con 5-FU es preparar la disolución de los Nanogeles (Solución A). En un vial con tapadera se disolvieron 100 mg de Nanogeles en 20 ml de agua en agitación constante por 48 horas. El siguiente paso es preparar la solución acuosa de 5-FU (Solución B) en un vial. Se pesan 30mg de 5-FU y se disuelven con 10 ml de agua con agitación constante (se debe cubrir la solución de inmediato). Se agregó la solución de 5-FU (Solución B) a los Nanogeles (Solución A) gota a gota, se deja 48 horas en agitación constante. La mezcla se pasa a un tubo cónico Falcón de 50 mL para centrifugarse a 10,000 rpm durante 1 hora. El sobrenadante obtenido se guarda en el congelador convencional y el sedimento se congela durante 48 horas. Una vez obtenido el sedimento congelado se procede a liofilizarlo por 48h. Se realiza la cuantificación del cargado de los Nanogeles colocando en un frasco con tapadera 10 mg del liofilizado en 10 mL de etanol, se agita vigorosamente y una vez disuelto se coloca 1ml de la mezcla en una cubetilla para leerse en el espectrofotómetro a 275 nm. También se procede a leer 1 mL del sobrenadante para determinar la capacidad y la eficiencia de cargado con las ecuaciones 1 y 2 (ANEXO 4). (Ciencias & Becerra, 2017)

III.2.7.2 Cargado de los Nanogeles con Curcumina.

Para realizar el cargado de Curcumina, previamente se debe realizar una curva de calibración para la obtención de los cálculos (ANEXO 2). El primer paso para realizar el cargado de los Nanogeles con Curcumina es preparar la disolución de los Nanogeles (Solución A). En un vial color ámbar con tapadera se disolvieron 40 mg de Nanogeles en 20 ml de agua destilada con agitación constante por 48 horas. El siguiente paso es preparar la solución alcohólica de Curcumina (Solución B) en un vial color ámbar (libre de luz). Se pesan 10mg de Curcumina y se disuelven con 1 ml de etanol de 96°C (se debe cubrir la solución de inmediato). Se agregó la mezcla de Curcumina (Solución B) a los Nanogeles (Solución A) gota a gota, se deja 48 horas en agitación sin tapadera para que la mezcla quedara libre de etanol. La mezcla se pasa a un tubo cónico Falcón de 50 mL para centrifugarse a 10,000 rpm durante 1 hora. El sobrenadante obtenido se guarda en el congelador convencional y el sedimento amarillo se congela durante 24 horas. Una vez obtenido el sedimento congelado se procede a liofilizarlo por 48h. Se realiza la cuantificación del cargado de los Nanogeles colocando en un frasco ámbar 10 mg del liofilizado en 10 mL de etanol, se agita vigorosamente y una vez disuelto se coloca 1ml de la mezcla en una cubetilla para leerse en el espectrofotómetro a 427 nm. También se procede a leer 1 mL del sobrenadante para determinar la capacidad y la eficiencia de cargado con las ecuaciones 1 y 2(ANEXO 5).(Manzanares-guevara et al., 2020)

III.2.8 Cinética de liberación *in vitro* de 5-FU.

Para los estudios de liberación controlada, se dispersan 5mg de nano partículas cargadas en 10ml de solución tampón pH 7.4 y luego se agregan a un tubo de diálisis. En otro tubo de diálisis se coloca una solución de referencia con el contenido de fármaco cargado en 5mg de nano partículas. Cada tubo de diálisis pre llenado se introduce en 50 mL de medio de liberación dentro de un matraz que contiene la solución tampón correspondiente (pH 1.2, 6.8 y 7.4) y GHS a la molaridad correspondiente de degradación. El matraz se coloca dentro de un baño de agitación que funciona a 37°C y una velocidad de agitación de 50 rpm. Se extraen alícuotas del medio (1 mL) a los tiempos de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 horas; se reemplaza el volumen con medio fresco en cada tiempo de muestreo. La fracción liberada de 5-FU se calculó a partir de mediciones de UV a 275nm y luego se cuantificó usando la curva de calibración previamente preparada específicamente para 5-FU.(Ciencias & Becerra, 2017)

III.2.8.1 Cinética de liberación *in vitro* de Curcumina.

Para los estudios de liberación controlada, se dispersan 6 mg del material cargado con CUR en 3 ml de solución tampón (pH 1.2, 6.8 y 7.4) y luego se agregan a un tubo de diálisis. En otro tubo de diálisis se coloca una solución de referencia con el contenido de CUR cargada en 6mg de nano partículas. Cada tubo de diálisis pre llenado se introduce en 30 ml de medio de liberación dentro de un matraz ámbar que contiene una solución de Tween 80 (0.5% v/v) en la solución tampón correspondiente y GHS a la molaridad correspondiente de degradación. El matraz se coloca dentro de un

baño de agitación que funciona a 37°C y una velocidad de agitación de 50 rpm. Se extraen alícuotas del medio (1 mL) a los tiempos de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 horas; se reemplaza el volumen con medio fresco (PBS/Tween 80, 0,5% v/v/GHS) en cada tiempo de muestreo. La fracción liberada de CUR se calculó a partir de mediciones de UV a 427 nm y luego se cuantificó usando la curva de calibración previamente preparada específicamente para CUR.(Manzanares-guevara et al., 2020)

III.2.9 Ensayo de citotoxicidad de los Nanogeles cargados con 5-FU y CUR.

Se cultivarán en monocapa células de melanoma en placas de cultivo de 96 pocillo con 2500 células/pocillo (Thermo SCIENTIFIC, *NunclonTM* delta Surface, Denmark). Se utilizará medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de l-glutamina, y 1% de una mezcla de penicilina (100 IU/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Las células serán mantenidas en incubación con una mezcla de aire: CO₂ / O₂ de 95:5 (%) y temperatura controlada a 37°C.

De esta manera, se administrarán volúmenes iguales a los cultivos celulares. La cantidad total de Nanopartículas será disuelta en 1mL de medio de cultivo (concentración 1mg/mL) y se adicionará 100 µL de medio de cultivo DMEM. Se dejarán incubando en las condiciones antes mencionadas por 48hr.

Los tratamientos serán etiquetados como sigue:

Tabla 5. Tratamientos para ensayo de citotoxicidad.

Grupos	Concentraciones								
	µg/ml								
5-FU Libre	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
CUR Libre	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
NG´s CAM10/BAAC	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
NG´sCAM7/BAAC	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
NG´sCAM7/BAAC-5-FU	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
NG´sCAM7/BAAC-CUR	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	

En todos los ensayos, se usan células no tratadas como control negativo (C-) y DMSO al 5% como control muerto positivo (C +), las células se incuban durante 24 h.

Los ensayos de viabilidad celular se llevarán a cabo después de 48hr de acuerdo con el método de Mosmann (1983). Después de la exposición celular a los diferentes tratamientos en estudio, la viabilidad celular será evaluada mediante el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); Se retirará el medio con el material de todos los pocillos y se adicionara una mezcla de medio fresco y MTT (concentración 0.5mg/mL) en cada pocillo y se incubaron por 4hr, transcurrido el tiempo de incubaciones adicionara 100uL de buffer de solubilidad y se incubaba toda la noche (de 8h a 12H) y se realiza la lectura espectrofotométrica a 620 nm (Lector de microplaca. Se obtienen los resultados para los cálculos correspondientes. Los resultados se normalizan a células no tratadas (100%) para obtener el porcentaje de viabilidad celular y se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media

(SEM) de triplicados para obtener el porcentaje de viabilidad celular calculado mediante la siguiente ecuación:

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

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

IV.1. Síntesis y caracterización de los monómeros carboxialquilmetacrilamidas

Se obtuvieron los 2 monómeros por medio de la reacción Schotten-Baumann. Se obtuvo un total de 4.25 gr de monómero 11-metacriloilamidoundecanóico (85% de rendimiento en la reacción). Polvo color blanquecino rosáceo con una consistencia ligeramente cerosa.

Para el caso del monómero 8-metacriloilamidooctanoico se obtuvo un total de 2.36 gr de monómero (60% de rendimiento). En total por dos reacciones.

Polvo color blanquecino con una consistencia física jabonosa semisólida.



Figura 8. Monómeros obtenidos a partir de la síntesis de carboxialquilmetacrilamidas (izquierda CAM/7, derecha CAM/10).

IV.1.1 Caracterización de los monómeros carboxialquilmetacrilamidas por espectrofotometría de infrarrojo.

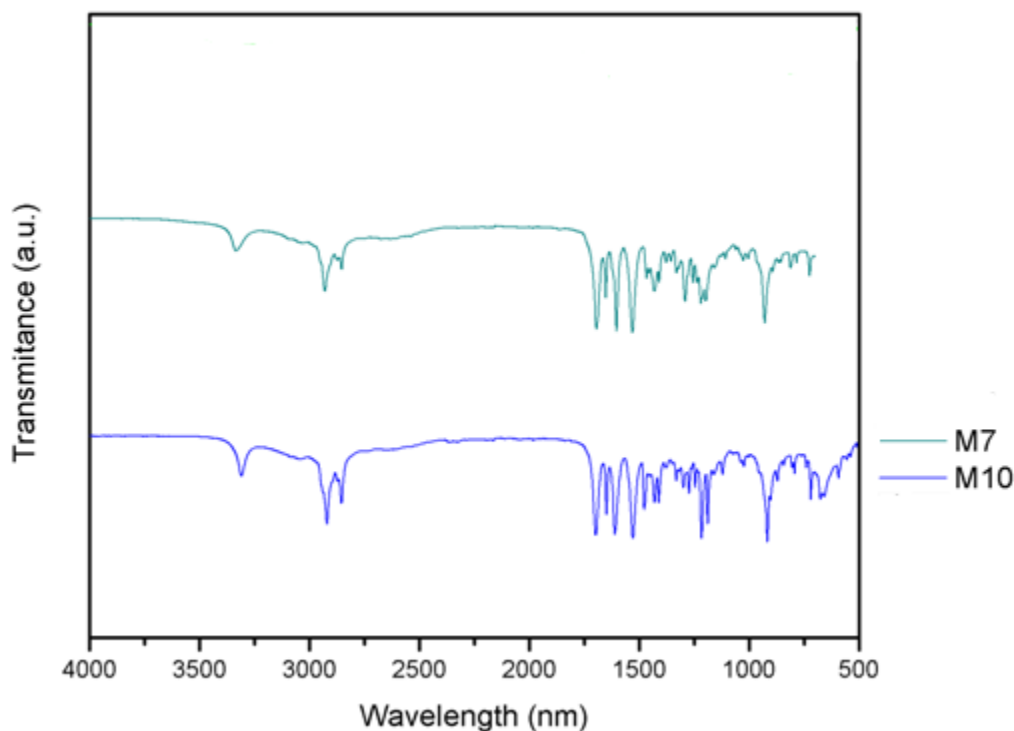


Figura 9. Espectrofotometría de infrarrojo de los monómeros M7 y M10.

Los grupos funcionales que se encontraron en el monómero M7 y M10 fueron los siguientes: la banda característica del enlace (N-H) de la amida se encuentra a 3333 y 3311 cm^{-1} ; a 2929 y 2919 cm^{-1} se observa la banda que representa al enlace (C-H), que se encuentra en la parte vinílica y alifática del monómero; a 1693 y 1697 cm^{-1} se observa la banda característica del grupo carboxilo (C=O), presente en la amida y el grupo carboxílico; seguido de esta banda a una longitud de onda de 1651 y 1648 cm^{-1} se observa la banda característica de la parte vinílica (C=C); y en las longitudes de onda 1530 y 1429 cm^{-1} , se pueden observar las bandas representativas de la parte alifática, que corresponden a (CH₃) y 1334 cm^{-1} , 1409 cm^{-1} (CH₂), respectivamente.

Finalmente, a la longitud de onda de 927 y 916 cm^{-1} se encuentra la banda característica del enlace (C-O), enlace que representa la presencia del grupo del ácido carboxílico.

Tabla 6. En la siguiente tabla se pueden apreciar las bandas características de los 2 monómeros:

<i>Enlaces</i>	<i>Monómeros</i>		<i>Longitud de onda cm^{-1}</i>
	<i>M7</i>	<i>M10</i>	
<i>N-H</i>	3333	3311	
<i>C-H</i>	2929	2919	
<i>C=O</i>	1693	1697	
<i>C=C</i>	1651	1648	
<i>CH₃</i>	1530	1429	
<i>CH₂</i>	1334	1409	
<i>C-O</i>	927	916	

IV.2. Síntesis y caracterización de Nanogeles de CAM/10/BAAC y CAM7/BAAC mediante el método de polimerización en emulsión.

Se obtuvieron Nanogeles dentro de una dispersión acuosa azul-blanquecina, con el método de polimerización en emulsión utilizando el monómero CAM10 y o CAM7 como material sensible al pH y BAAC como entrecruzante. El proceso de polimerización inició con una solución transparente y después, la mezcla de reacción se volvió turbia entre color tornasol en ambas reacciones.



Figura 10. Nanogeles CAM10/BAAC y CAM7/BAAC sintetizados.

Se realizaron múltiples reacciones para ambas formulaciones de las cuales el diámetro hidrodinámico (Dh) e índice de polidispersidad (PDI) se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. PDI y Dh de los Nanogeles CAM10/BAAC y CAM7/BAAC sintetizados.

Reacción	Dh (nm)	PDI
CAM10/BAAC 1	140.8 ± 0.95	0.009
CAM10/BAAC 2	144.5	0.005
CAM10/BAAC 3	144.6	0.005
CAM7/BAAC 1	76.2	0.214
CAM7/BAAC 2	74.20	0.218
CAM7/BAAC 3	78.3 ± 7.5	0.217

IV.2.1. Diámetro hidrodinámico y Potencial Z de Nanogeles CAM7/BAAC y CAM10/BAAC

La caracterización de los Nanogeles se realizó pasando por varias pruebas, inicialmente se leyeron muestras directas de síntesis en el DLS y también se midió el efecto del tamaño del diámetro hidrodinámico a diferentes valores de p H.

Tabla 8. Nanogeles de CAM10/BAAC a diferentes pH.

p H	Dh (nm)	Potencial Z (mV)	PDI
Agua	144.8	0.071	0.009
1.2	6258	0.063	0.211
6.8	133.8	-0.23	0.041
7.4	138.1	-17.8	0.075

Tabla 9. Nanogeles de CAM7/BAAC a diferentes pH.

p H	Dh (nm)	Potencial Z (mV)	PDI
Agua	76.2	0.01	0.0214
1.2	7501	0.056	0.445
6.8	210.8	-0.07	0.080
7.4	174.9	-0.06	0.037

En los Nanogeles CAM10/BAAC y CAM7/BAAC tratados con agua y buffer con pH 1.2 se muestran con Potencial Z positivos y tamaños de partícula más elevados, eso puede ser consecuencia a la aglomeración que se deriva cuando hay en pH's más ácidos, en cambio para ambas formulaciones en buffer pH 6.8 y 7.4 se muestran de un

tamaño menor y un Potencial Z negativo, con un tamaño de partícula no mayor a 200 nm y un PDI menor a 1. Con respecto a la reconstitución después de liofilizar (ambos liofilizados se encontraban con las mismas especificaciones físicas, polvo fino blanquecino, sólido y esponjoso), ambas formulaciones muestran estabilidad e uniformidad en los tamaños de partícula y un Potencial Z negativo. Es importante señalar que este efecto puede ser debido a la interacción del tensoactivo con cada monómero, sin embargo, en los 2 monómeros ácidos no hay una variabilidad significativa en los tamaños.

Tabla 10. Nanogeles liofilizados y reconstituidos.

Tipo de	Buffer	Dh	Potencial Z	PDI
Nanogeles				
CAM10/BAAC	pH 7.4	139.7	-33.7 mV	0.073
CAM7/BAAC	pH 7.4	74.2	-18.2 mV	0.193

IV.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Los estudios morfológicos de los Nanogeles se caracterizaron por un análisis de microscopía FESEM. Se muestra el resultado obtenido en donde se encontró que los Nanogeles presentaron una morfología con estructura esférica; por otro lado, la formación de agregados es evidente, sin embargo, aquellas que no se encontraban agregadas mostraban una homogeneidad en la distribución del tamaño de 100 nm aproximadamente.

Las nanopartículas presentaron una superficie color negro debido a la acumulación de acetato de uranilo en las nanopartículas cargadas negativamente, similar a lo que se observó un artículo (Cornejo-Bravo et al., 2021).

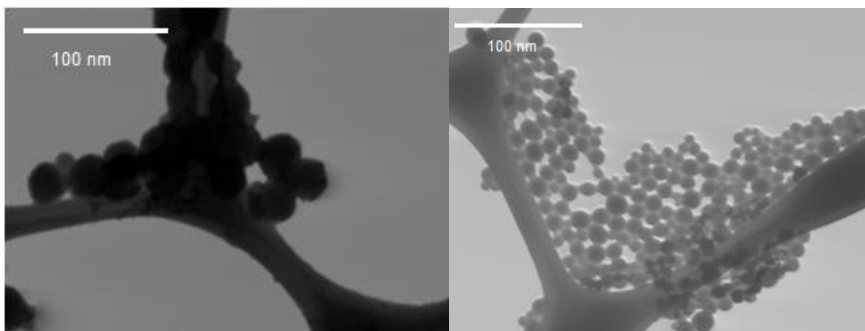


Figura 11. Imágenes de microscopia FESEM, Izquierda: (CAM10/BAAC), derecha: (CAM7/BAAC).

IV.4 Estudios de degradación de los Nanogeles sintetizados en medio redox.

La degradación de Nanogeles reticulados con BAAC será evaluada por DLS midiendo los cambios de tamaño de Nanogeles en respuesta a diferentes concentraciones de glutatión (GSH) (6,8 y 10 mM) en una dispersión de 1.0 mg/mL de Nanogeles preparado en medio acuoso a 7.4 a 37 ° C. Las muestras se agitaron a 250 rpm durante 48 Hrs, y los cambios de tamaño de los Nanogeles reticulados con BAAC se miden mediante DLS cada 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 Hrs.

IV. 4.1. Hidrólisis de Nanogeles CAM10/BAAC en buffer a pH 7.4

Se tomaron muestras cada 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 hrs.y se midió el diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad con el DLS, la siguiente tabla los tamaños de partícula y PDI señalan que los Nanogeles ya están degradados.

Tabla 11. Resultados de hidrólisis de los Nanogeles CAM10/BAAC a pH 7.4 con diferentes concentraciones de glutatión.

Tiempo de muestreo	0 μM		6 μM		8 μM		10 μM		
	Horas	Dh	PDI	Dh	PDI	Dh	PDI	Dh	PDI
1		335	0.32	470	0.39	470	0.39	84	0.24
2		706	0.32	166	0.19	206	0.22	252	0.23
4		615	0.62	869	0.62	217	0.287	72	0.15
8		917	0.19	166	0.18	511	0.41	230	0.26
12		1820	0.87	2368	0.79	648	0.56	1802	0.59
24		2297	0.97	1948	0.87	302	0.35	614	0.49
36		3034	0.87	2568	0.88	5148	0.70	980	0.70
48		1734	0.83	947	0.73	4345	0.90	1059	0.79

Hidrólisis de Nanogeles pH 7.4 a diferentes tiempos

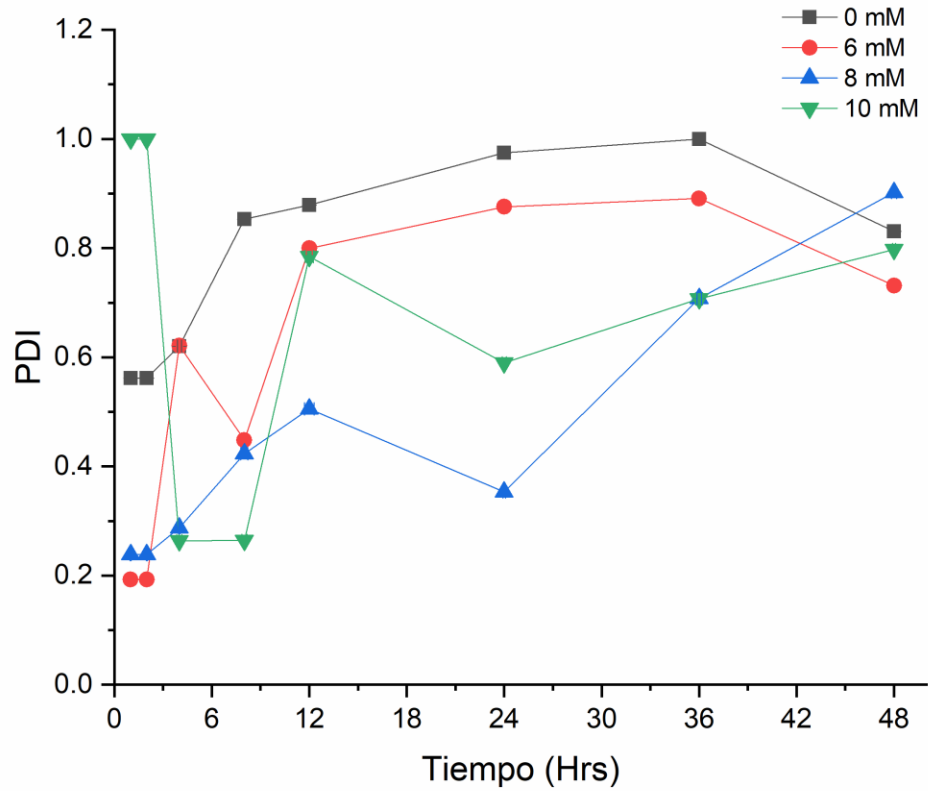


Figura 12. Hidrólisis de Nanogeles CAM10/BAAC a pH 7.4.

IV. 4.2 Hidrólisis de Nanogeles CAM7/BAAC en buffer a pH 7.4

Se tomaron muestras cada 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 Hrs. y se midió el diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad con el DLS, la siguiente tabla los tamaños de partícula y PDI señalan que los Nanogeles ya están degradados.

Tabla 12. Resultados de hidrólisis de los Nanogeles CAM7/BAAC a pH 7.4 con diferentes concentraciones de glutatión.

Tiempo de muestreo	0 μM		6 μM		8 μM		10 μM		
	Horas	Dh	PDI	Dh	PDI	Dh	PDI	Dh	PDI
1		226	0.42	161	0.69	149	0.69	150	0.24
2		259	0.82	249	0.69	449	0.82	164	0.73
4		161	0.42	118	0.72	136	0.56	124	0.56
8		227	0.45	161	0.48	172	0.41	251	0.46
12		142	0.47	1051	0.71	148	0.55	178	0.69
24		211	0.47	409	0.76	61	0.95	178	0.89
36		177	0.37	573	0.68	112	0.90	79	0.70
48		290	0.43	296	0.74	258	0.60	167	0.45

IV. 4.3 Hidrólisis de Nanogeles pH 7.4 a diferentes tiempos

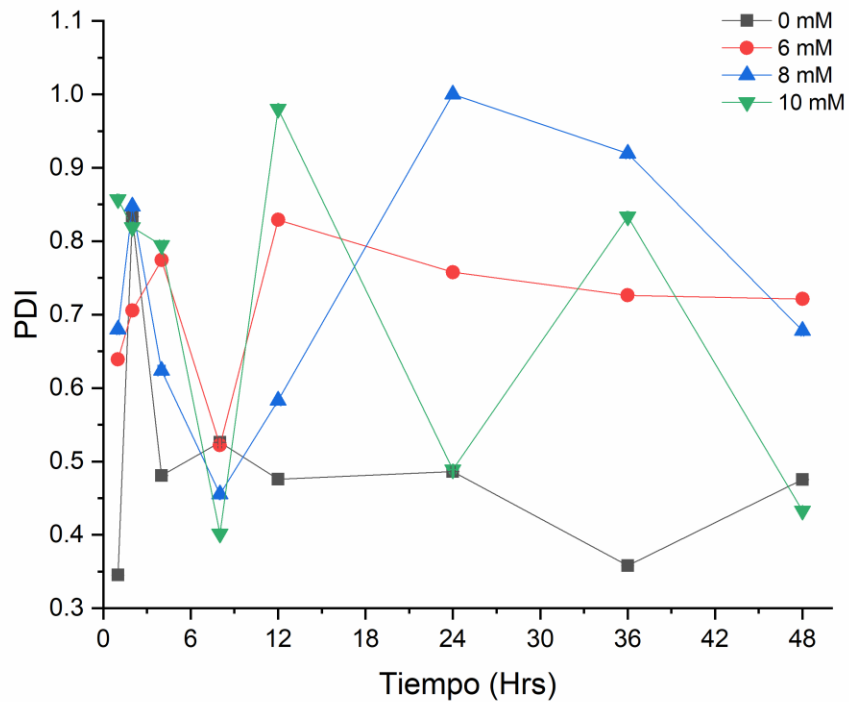


Figura 13. Hidrólisis de Nanogeles CAM7/BAAC a pH 7.4.

IV. 5 Cargado de los Nanogeles con 5-FU y Curcumina.

Los experimentos de cargado con 5-FU y CUR en los Nanogeles CAM10/BAAC Y CAM7/BAAC se realizaron de acuerdo al método de equilibrio. Con base a Ashwanikumar et., 2012 y, Zhu et al., 2013, los grupos carboxílicos presentes en las cadenas del polímero pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos amida en las moléculas de 5-FU para conformar complejos intermoleculares, por tanto, esta podría ser la forma en la que se forman los complejos polímero-fármaco. Para cuantificar la cantidad de fármaco cargado, se utilizaron los cálculos mostrados en los ANEXOS con los cuales se obtiene el porcentaje de carga y la eficiencia. En la tabla se muestran los

resultados obtenidos del cargado de CUR y 5-FU, de acuerdo con los cálculos utilizados en el Anexo 5 y la curva de calibración obtenida por Espectrofotometría.

Tabla 14. Resultados de la capacidad de carga y eficiencia de carga de 5-FU de ambas formulaciones de Nanogeles.

Nanogeles Reconstituidos y Fármaco	mg utilizados de Nanogeles	mg utilizados de fármaco	mg Peso del liofilizado cargado	ABS	% Capacidad de carga	% Eficiencia de carga
CAM10/BAAC+5-FU	100	30	37	0.102	4	4.7
CAM7/BAAC+5-FU	100	30	81	1.825	4.7	12.7

Tabla 15. Resultados de la capacidad de carga y eficiencia de carga de CUR de ambas formulaciones de Nanogeles.

Nanogeles Reconstituidos y Fármaco	mg utilizados de Nanogeles	mg utilizados de fármaco	mg Peso del liofilizado cargado	ABS	% Capacidad de carga	% Eficiencia de carga
CAM10/BAC+CUR	120	30	76	0.338	1.5	4.6
CAM7/BAAC+CUR	120	30	103	10.326	5.75	19.7

IV.6 Cinética de liberación *in vitro* de 5-FU y CUR

Los experimentos para la liberación del 5-FU y CUR incorporado a los Nanogeles se realizaron variando el pH del medio de liberación, con la finalidad de analizar la aplicación de los Nanogeles en la liberación controlada y sostenida de los fármacos en condiciones fisiológicas similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal. Para cuantificar la cantidad de fármaco liberado con respecto a su absorbancia, se utilizaron las curvas de calibración mostradas en los anexos para cada pH. Por otro lado, para obtener la fracción liberada con respecto al tiempo, se utilizaron los cálculos mostrados en los anexos. El estudio de liberación *in vitro* de los Nanogeles de CAM10 y CAM7 se realizó mediante el uso de bolsas de diálisis conteniendo buffers a pH 1.2 y 7.4, junto la muestra, a 37°C. El patrón de liberación de nuestra nano formulación a los diferentes pH se muestra en la figura en donde se logra apreciar que siguió, en pH ácido, se liberó una baja concentración de fármaco, aproximadamente menos del 10% en 24 h. Por otro lado, a los pH de 1.2 y 7.4 se observó una liberación de 20% a las 2h y 30% a las 4 h respectivamente, con una liberación sostenida a lo largo del tiempo en el caso del pH 7.4.

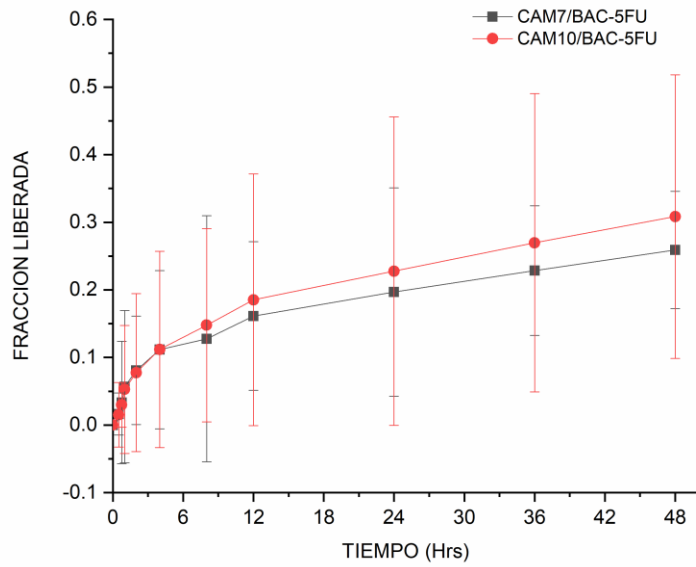


Figura 14. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC 5-FU libre a pH 7.4 (promedio \pm D.E., n=3).

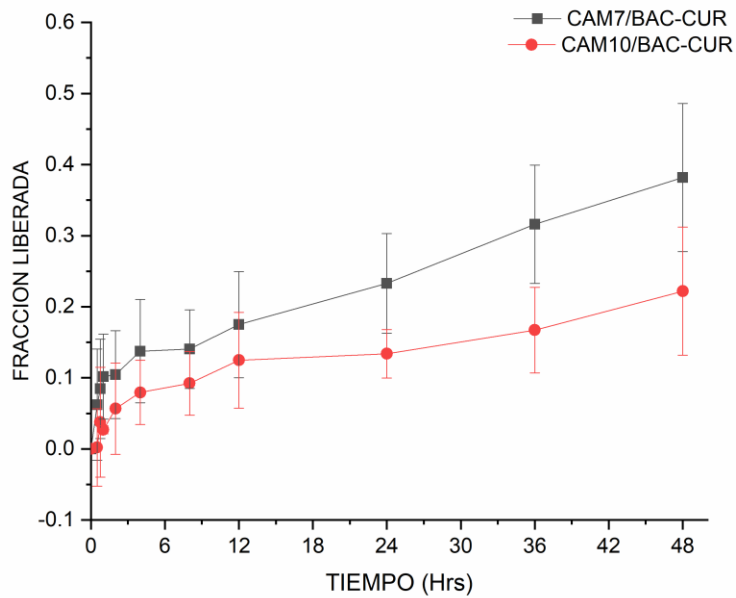


Figura 15. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC CUR libre a pH 7.4 (promedio \pm D.E., n=3).

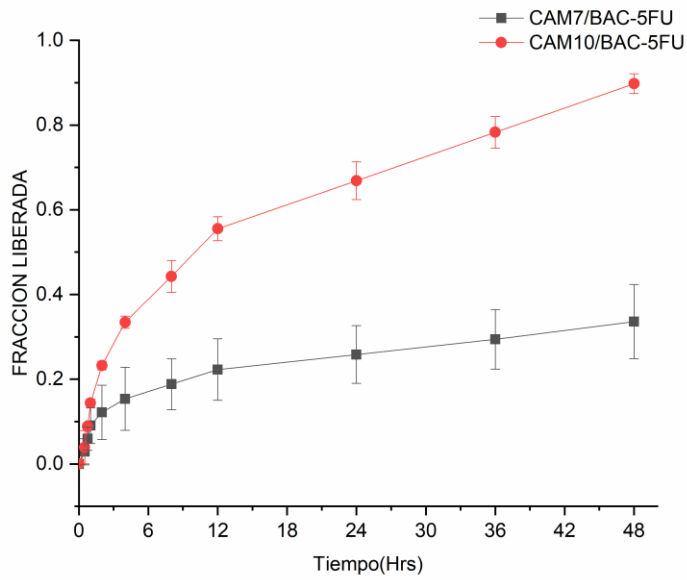


Figura 16. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC 5-FU libre a pH 1.2 (promedio \pm D.E., n=3).

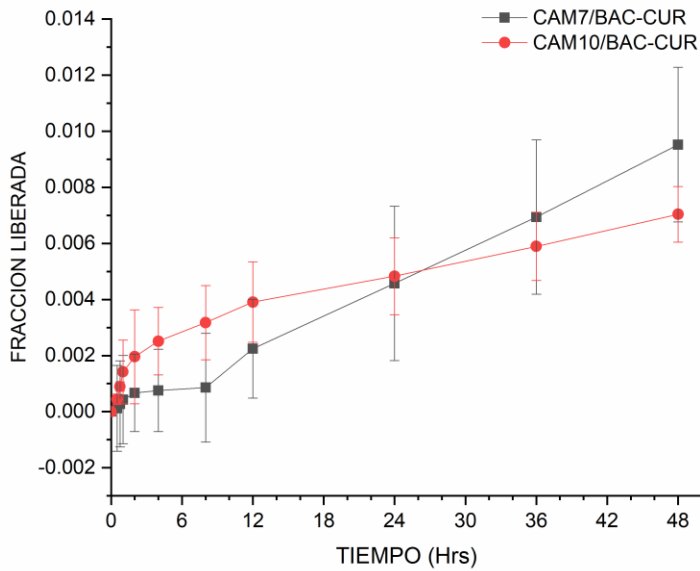


Figura 17. Fracción liberada promedio de CAM10/BAAC VS CAM7/BAAC CUR libre a pH 1.2 (promedio \pm D.E., n=3).

IV.7. Ensayo de citotoxicidad de los Nanogeles.

El perfil de viabilidad celular reveló que el 5-FU libre, los Nanogeles cargados con 5-FU y los Nanogeles libres, son citocompatibles a todas las concentraciones empleadas en el ensayo de MTT ya que todas las células se encontraron con una viabilidad mayor al 60% a las 48 Hrs. Se utilizaron células de Melanoma y se encontró una citotoxicidad mayor por parte de los Nanogeles CAM10/BAAC. El método de MTT es realizado y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble que toma un color morado, formazan. El indicador de la integridad de las mitocondrias es captado por la capacidad que tienen las células de reducir el MTT, el cual es un indicador de viabilidad celular. Así mismo este ensayo nos da como resultado una información más detallada sobre la citotoxicidad del compuesto.

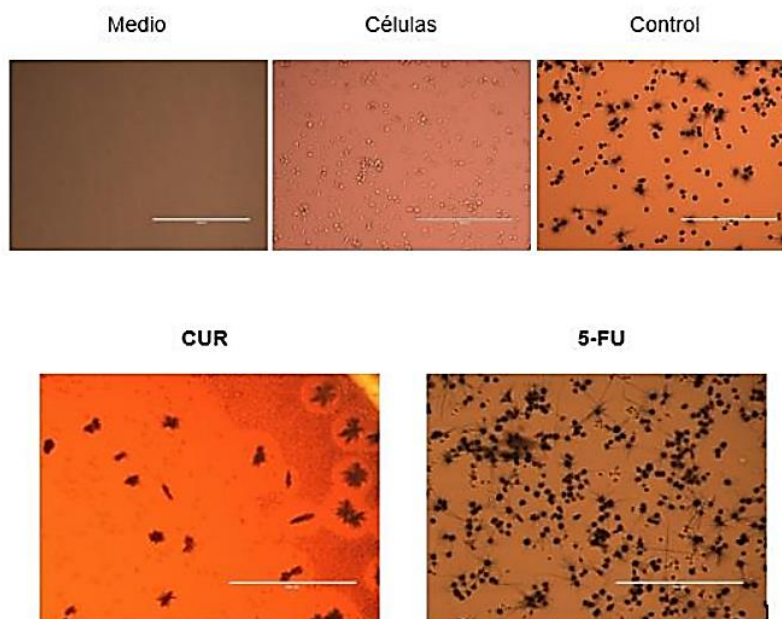


Tabla 15. Imágenes de células tratadas con Nanogeles cargados con CUR y 5- FU por el método de MTT obtenidas de FLoid™ Cell Imaging Station.

Viabilidad Celular

Para el estudio de viabilidad celular, los resultados que se esperan son que el fármaco 5-FU sea tóxico para las células de tal manera que se produzca la apoptosis celular en las células afectadas con cáncer y la CUR que no presente una toxicidad elevada, ya que este fármaco funciona como protector celular y también puede provocar apoptosis, pero exclusivamente en células cancerígenas.

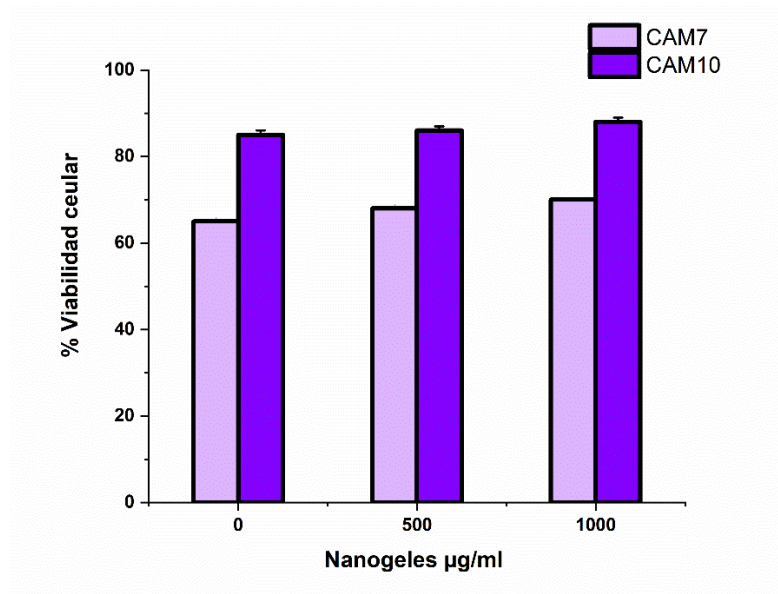


Figura 18. Viabilidad celular de Nanogeles CAM10/BAAC Y CAM7/BAAC libres en el ensayo MTT en la línea celular de Melanoma (promedio \pm D.E., n=3).

En la Figura 18, se observa que los nanogeles reticulados con BAAC presentan toxicidad baja, teniendo como resultado Nanogeles CAM 7 con más presencia de toxicidad celular que en los nanogeles de CAM10.

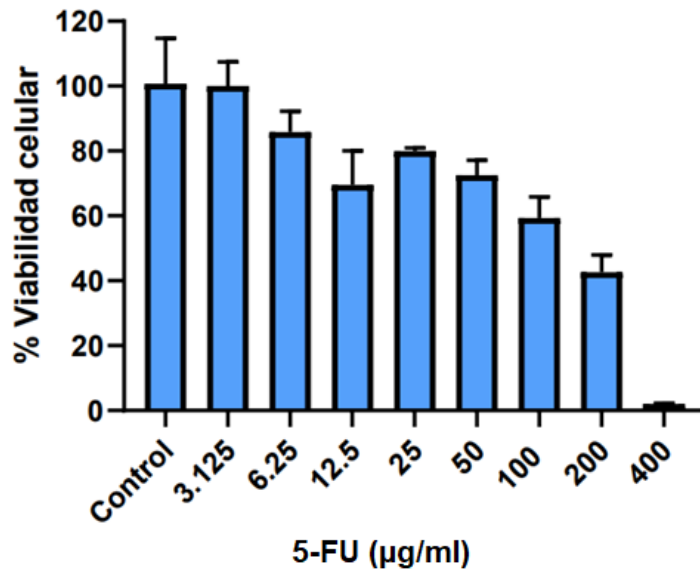


Figura 19. Viabilidad celular 5-FU.

En la figura 19, se observa que el 5-FU libre presenta toxicidad a la concentración de 400 µg/ml, este fármaco al ser citotóxico, genera apoptosis en células cancerosas y debido a ello es representativo del resultado. Posterior a que las dosis disminuyen, la toxicidad baja.

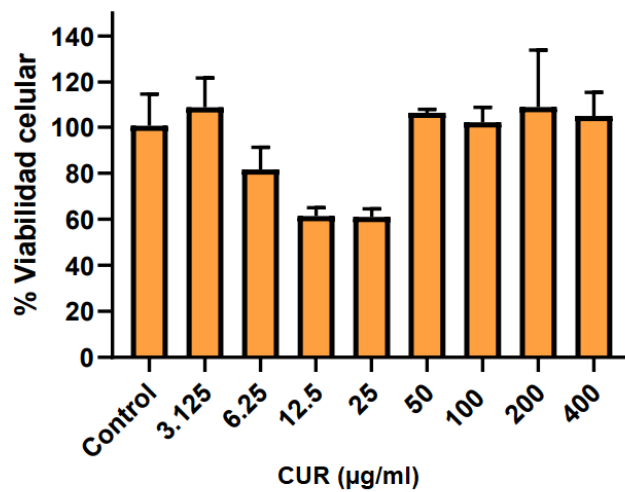


Figura 20. Viabilidad celular de CUR.

En la figura 15, se puede observar que el fármaco Curcumina libre presenta una toxicidad mínima en las concentraciones de 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$ esto sucede ya que la curcumina funciona como fármaco protector celular y así mismo como inductor de apoptosis.

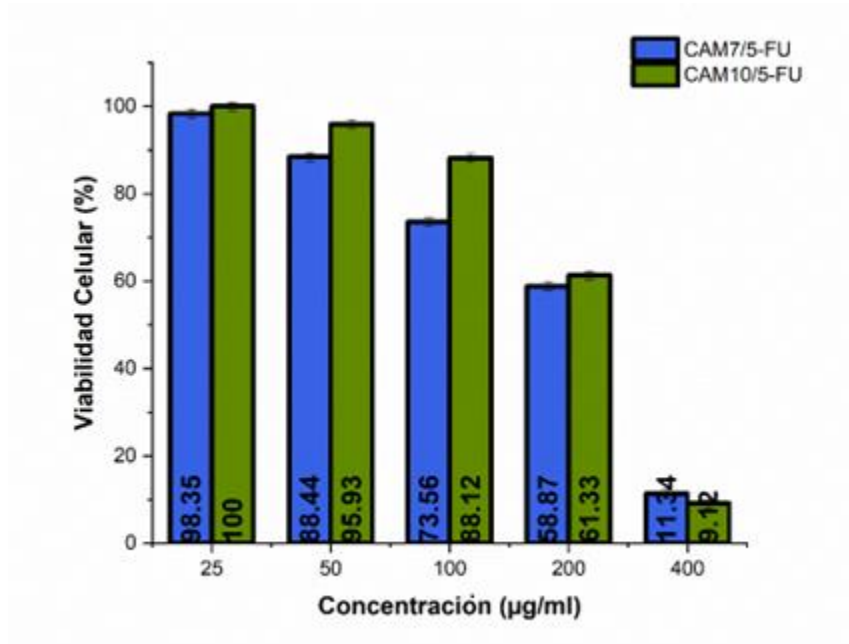


Figura 21. Viabilidad celular de CAM7/BAAC y CAM10/BAAC cargadas con 5-FU.

En la figura 21, se puede observar que las nanopartículas reticuladas con BAAC cargadas con el fármaco de 5-FU resultaron tóxicas en ambas formulaciones, la concentración más alta que fue 400 $\mu\text{g/ml}$ se puede observar que la toxicidad del fármaco empieza a disminuir notoriamente, lo cual nos resulta favorable para este proyecto.

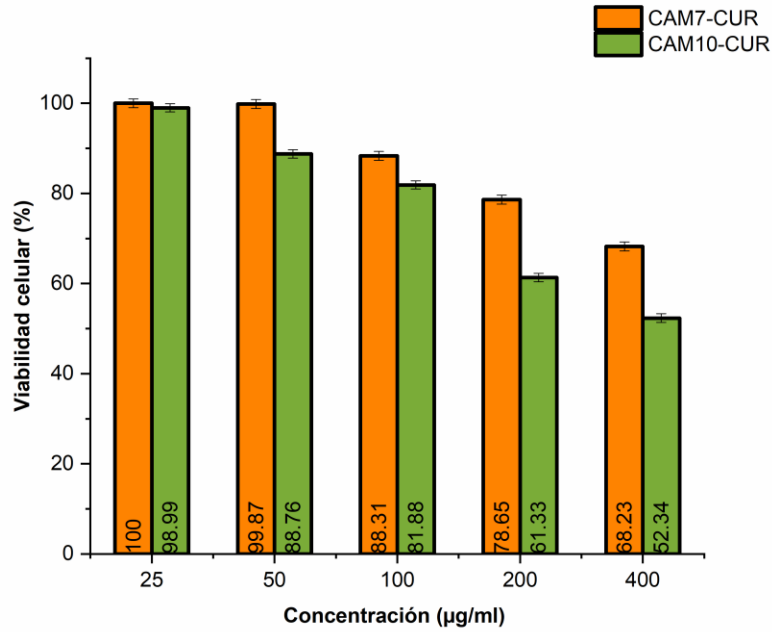


Figura 22. Viabilidad celular de CAM7/BAAC y CAM10/BAAC cargadas con CUR.

En la figura 22, se puede observar que los nanogeles reticulados con BAAC al ser cargadas con CUR presentan una toxicidad menor a comparación de los nanogeles libres, las dos formulaciones presentan una viabilidad celular con porcentajes sin embargo los nanogeles CAM7 reticulados con BAAC presentan menor toxicidad con la formulación de CUR a comparación de la formulación con CAM10.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

En último término, es posible sintetizar Nanogeles de CAM10/BAAC y CAM7/BAAC mediante polimerización en emulsión. El método de síntesis es eficiente y eficaz, mostrando los Nanogeles características de sensibilidad a diferentes concentraciones de pH, con cambios más drásticos a pH 1.2 debido a la ausencia de cargas por el colapso de los Nanogeles al encontrarse unidos hidrofobicamente, provocando así Nanogeles aglomerados y de mayor tamaño. Por otro lado, a pH de 6.8 y 7.4, se obtuvieron diámetros hidrodinámicos pequeños, lo cual, podría deberse a que el polímero se encuentra a un pH muy cercano o por encima de su pKa.

La caracterización por medio de Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), nos confirmó las características morfológicas externas de nuestros Nanogeles, mostrando NG's esféricos y con una polidispersión uniforme.

La estabilidad de nuestros Nanogeles no mostro degradación, o cambios al estado físico/químico de nuestras formulaciones y debido a ello el cargado de los mismos con 5-FU y CUR se realizaron acuerdo al método.

Se determino posteriormente las capacidades de carga y liberación de ambas formulaciones con sus respectivos fármacos evaluando la participación más evidente de la Curcumina en la formulación de CAM7/BAAC y el 5-FU en CAM10/BAAC, se analizó el efecto citotóxico en células de melanoma con el método MTT en ambas formulaciones, destacando que la formulación con CUR tuvo ciertos errores de efecto colorimétrico, debido a que la CUR presenta una pigmentación muy fuerte, el formazan muestra diferente contraste y al momento del análisis de placa da un conteo erróneo, es necesario reformular el método para determinar si la Curcumina presenta un efecto

protector o citotóxico ya que la función que tiene como molécula reparadora es la protección celular pero también es inductora de la muerte celular.

El estudio de hidrólisis de los Nanogeles con glutatión a diferentes concentraciones para comprobar la respuesta redox en condiciones de biodegradación nos muestra que nuestras formulaciones pueden tener este tipo de respuesta gracias a la participación de nuestro entrecruzante dándonos un espectro de respuesta mayor para la liberación de diferentes fármacos, especialmente citotóxicos, ya que el microambiente tumoral presenta concentraciones diferentes al microambiente normal celular y eso hace favorable el uso de componentes de liberación específica como estos Nanogeles.

Como trabajo futuro los Nanogeles de CAM10/BAAC Y CAM7/BAAC podrían ser analizados con una línea celular de cáncer de colon para evaluar su participación dirigida a este tipo de padecimiento en específico, así como la implementación de una forma farmacéutica para los mismos.

CAPITULO VI. REFERENCIAS.

Agarwal, N., Chandra, A., & Tyagi, L. K. (2011). Herbal medicine: Alternative treatment for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(9), 2249–2258.

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368507463%5Cnhttp://www.ijpsr.com/V2I9/1> Vol. 2(9),2011, IJPSR, RE-314, Review 1.pdf

Andrade-Meza, A., Arias-Romero, L. E., Armas-López, L., Ávila-Moreno, F., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., García-Castillo, V., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Juárez-Avelar, I., Leon-Cabrera, S., Mendoza-Rodríguez, M. G., Olguín, J. E., Perez-Lopez, A., Pérez-Plasencia, C., Reyes, J. L., Sánchez-Pérez, Y., Terrazas, L. I., Vaca-Paniagua, F., Villamar-Cruz, O., & Rodríguez-Sosa, M. (2023). Mexican Colorectal Cancer Research Consortium (MEX-CCRC): Etiology, Diagnosis/Prognosis, and Innovative Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2115. <https://doi.org/10.3390/ijms24032115>

Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, 9, 1–20. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.520>

Brier, J., & lia dwi jayanti. (2020). *Title*. 21(1), 1–9. <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>

Castro-Vidal, D. A., Obeso-Vera, C., Suarez-Meraz, K. A., Lara-Molinero, B. M., Serrano-Medina, A., & Cornejo-Bravo, J. M. (2016). Thermal and PH sensitive NANO/microgels of N-isopropylacrylamide and carboxyalkyl methacrylates. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 11(1), 123–132.

Cheng, R., Feng, F., Meng, F., Deng, C., Feijen, J., & Zhong, Z. (2011). Glutathione-

responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 152(1), 2–12.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.030>

Chhikara, B. S., & Parang, K. (2022). Chemical Biology LETTERS Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters Chem. Biol. Lett*, 2023(1), 451. <https://pubs.thesciencein.org/cbl>

Ciencias, E. N., & Becerra, C. D. (2017). *Universidad autónoma de baja california*.

Cornejo-Bravo, J. M., Becerra, C. D., Palomino, K., Magaña, H., Rivero, I., López-Maldonado, E., & Serrano-Medina, A. (2021). Copolymeric nano/microgels of N-isopropylacrylamide and carboxyalkyl methacrylamides: Effect of methylene chains and the ionization state of the weak acids on size and sensitivity to pH and temperature. *Soft Materials*, 19(1), 89–99.

<https://doi.org/10.1080/1539445X.2020.1769130>

Cornejo-bravo, J. M., Cordova-guerrero, I., & Maga, H. (2017). *Journal of Drug Delivery Science and Technology pH-dependent release of antihypertensives from complexes with poly (carboxyalkyl methacrylamides)*. 39, 508–515.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.008>

Du, J. Z., Sun, T. M., Song, W. J., Wu, J., & Wang, J. (2010). A tumor-acidity-activated charge-conversional nanogel as an intelligent vehicle for promoted tumoral-cell uptake and drug delivery. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(21), 3621–3626. <https://doi.org/10.1002/anie.200907210>

Ernphglfr, K., & Frp, E. (n.d.). *Fundamentos-Oncologia-Unam*.

Espinosa-Tamez, P., Suazo-Zepeda, E., Sánchez-Blas, H., Meneses-Medina, M.,

- Huitzil-Meléndez, F. D., Loon, K. Van, Potter, M. B., & Lajous, M. (2022). National and state-level colorectal cancer mortality trends in Mexico, 1998-2018. *Salud Publica de Mexico*, *64*(1), 5–13. <https://doi.org/10.21149/12522>
- Farinha, P., Pinho, J. O., Matias, M., & Gaspar, M. M. (2021). Nanomedicines in the treatment of colon cancer: a focus on metallodrugs. *Drug Delivery and Translational Research*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00916-7>
- González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I., & Elguero, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: Chemistry, structural studies and biological properties | Curcuminay curcuminoides: Química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, *81*(4).
- Hajebi, S., Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Ahmadi, S., Rabiee, M., Roghani-Mamaqani, H., Tahriri, M., Tayebi, L., & Hamblin, M. R. (2019). Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, *92*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.018>
- Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., Lim, Y. C., Kibria, K. M. K., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W., & Hadi, M. A. (2022). Colorectal Cancer : A Review of Carcinogenesis , Global. *Cancer*, *14*(1732), 1–25.
- Iyer, S., & Das, A. (2021). Responsive nanogels for anti-cancer therapy. *Materials Today: Proceedings*, *44*, 2330–2333. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.415>
- Kabir, M. T., Rahman, M. H., Akter, R., Behl, T., Kaushik, D., Mittal, V., Pandey, P., Akhtar, M. F., Saleem, A., Albadrani, G. M., Kamel, M., Khalifa, S. A. M., El-Seedi, H. R., & Abdel-Daim, M. M. (2021). Potential role of curcumin and its

nanoformulations to treat various types of cancers. *Biomolecules*, 11(3), 1–39.

<https://doi.org/10.3390/biom11030392>

Kumar, P., Liu, B., & Behl, G. (2019). A Comprehensive Outlook of Synthetic Strategies and Applications of Redox-Responsive Nanogels in Drug Delivery. *Macromolecular Bioscience*, 19(8), 1–28. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900071>

Lee, P. Y., Tuan-Mu, H. Y., Hsiao, L. W., Hu, J. J., & Jan, J. S. (2017). Nanogels comprising reduction-cleavable polymers for glutathione-induced intracellular curcumin delivery. *Journal of Polymer Research*, 24(5), 1–10.

<https://doi.org/10.1007/s10965-017-1207-6>

Li, Z., Huang, J., & Wu, J. (2021). PH-Sensitive nanogels for drug delivery in cancer therapy. *Biomaterials Science*, 9(3), 574–589. <https://doi.org/10.1039/d0bm01729a>

Liu, L., Yao, W. D., Rao, Y. F., Lu, X. Y., & Gao, J. Q. (2017). pH-responsive carriers for oral drug delivery: Challenges and opportunities of current platforms. *Drug Delivery*, 24(1), 569–581. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1279238>

Manzanares-guevara, L. A., Licea-claverie, A., Oroz-parra, I., Bernaldez-sarabia, J., Diaz-castillo, F., & Licea-navarro, A. F. (2020). *Smart Nanoformulation Based on Stimuli-Responsive Nanogels and Curcumin : Promising Therapy against Colon Cancer*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04390>

Mauri, E., Giannitelli, S. M., Trombetta, M., & Rainer, A. (2021). Synthesis of nanogels: Current trends and future outlook. *Gels*, 7(2), 1–23.

<https://doi.org/10.3390/gels7020036>

Rol, E. L., Ácido, D. E. L., En, H., Desarrollo, E. L., & Daiana, L. (2022). *Microambiente tumoral: el rol del ácido hialurónico en el desarrollo de resistencia a la*

quimioterapia.

Sánchez, J. (2014). *Glutación en células cancerosas: efecto de los polifenoles naturales y posibles aplicaciones terapéuticas.* 85–86.

Sedlak, J. C., Yilmaz, Ö. H., & Roper, J. (2023). Metabolism and Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 18(1), 467–492.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-041113>

Serrano-Medina, A., Cornejo-Bravo, J. M., & Licea-Claverie, A. (2012). Synthesis of pH and temperature sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369(1), 82–90.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.045>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

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

Vargas-ruiz, H. U. (2023). *Prevalencia de tratamientos alternativos en pacientes del área de oncología en el noreste de México Prevalence of alternative treatments in patients in the oncology area in northeastern Mexico.* 22(1).

<https://doi.org/10.19136/hs.a22n1.4882>

Wang, S., Huang, P., & Chen, X. (2016). Stimuli-Responsive Programmed Specific Targeting in Nanomedicine. *ACS Nano*, 10(3), 2991–2994.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00870>

- Weinberg, R. A. (2008). Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*, 29(6), 1092–1095. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn104>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). *Nanoparticles as drug delivery systems*.
- Wong, K. E., Ngai, S. C., Chan, K. G., Lee, L. H., Goh, B. H., & Chuah, L. H. (2019). Curcumin nanoformulations for colorectal cancer: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 10(March). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00152>
- Zha, L., Banik, B., & Alexis, F. (2011). Stimulus responsive nanogels for drug delivery. *Soft Matter*, 7(13), 5908–5916. <https://doi.org/10.1039/c0sm01307b>

ANEXOS

ANEXO 1. Cálculos para la síntesis de Nanogeles de por el método de polimerización en emulsión.

Formulación 1 y 2:

Reacción 1	Reactivo	Cantidades
Monómero	CAM10/CAM7 1%	0.5 g (37.12 mmol)
Entrecruzante	BAAC 5%	24 mg (1.85 mmol)
Iniciador	APS 2%	0.01186 mol
Tensoactivo	DBS	50 mg (3.43 mmol)

Cálculos:

Reacción total 50 ml

Monómero:

CAM10 (ácido 11-metacriloilamido undecanóico/ CAM7 (8-metacriloilamido aminooctanoico) al 1% w/w

Moles totales= (g)/(PM)

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

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

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

g = (0.0026mol) (260.38 g/mol) (0.05) = 0.024 g

Estabilizante DBS (Dodecilbenculfato de sodio) 50 mg

(0.5g) (0.1g) = 0.5g

moles= (g) / (PM)

moles de dbs = (0.5g) / (288.38 g/mol) = 3.43 moles

Iniciador APS (Persulfato de amonio) 2%

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

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

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

se pesaron 32 mg 32mg ----- 8ml H₂O 11.86 mg--- X

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

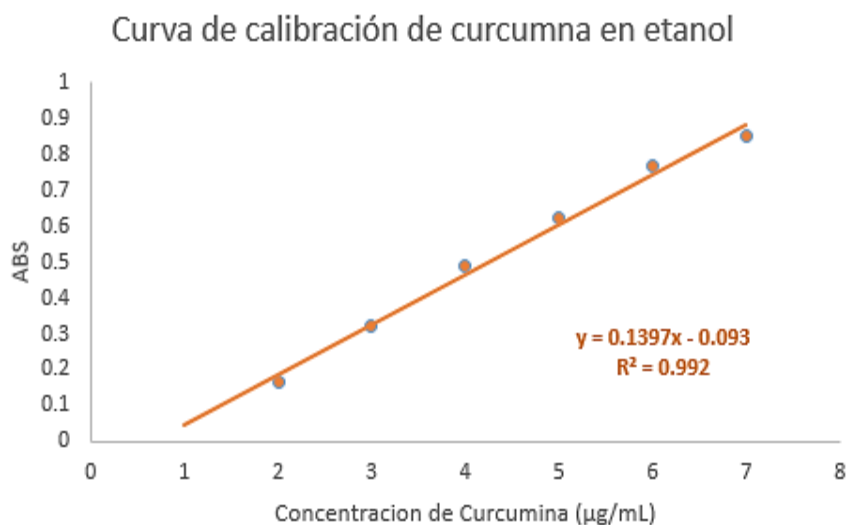
ANEXO 2. Curva de calibración para el cargado de Curcumina con etanol por UV-VIS

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

SOLUCION MADRE: 5 mg de Curcumina aforado a 10 mL de etanol.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABS 427nm
10 μL sln madre/ 10 mL etanol	0.5	0.090
20 μL sln madre/ 10 mL etanol	1	0.165
40 μL sln madre/ 10 mL etanol	2	0.324
60 μL sln madre/ 10 mL etanol	3	0.487
80 μL sln madre/ 10 mL etanol	4	0.622
100 μL sln madre/ 10 mL etanol	5	0.766
120 μL sln madre/ 10 mL etanol	8	0.851

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

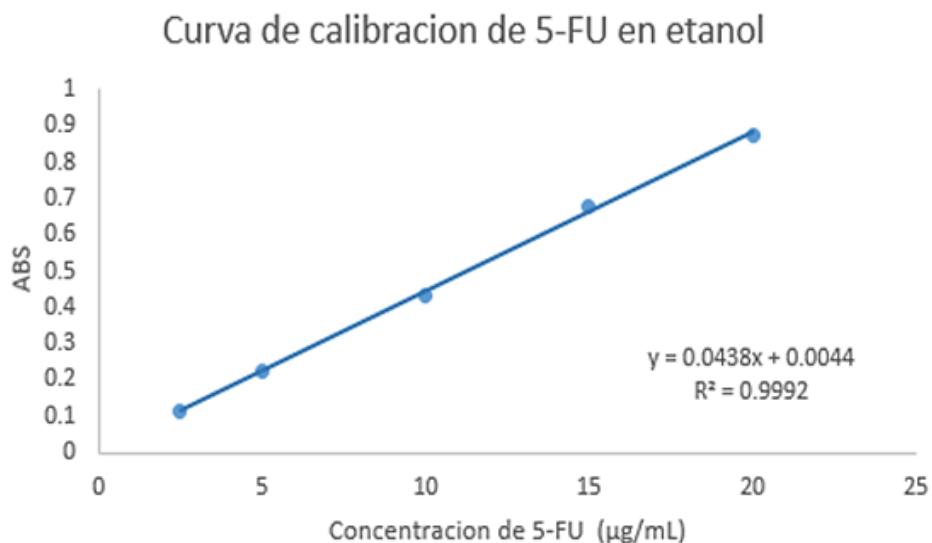


ANEXO 3. Curva de calibración para el cargado de 5-Fluorouracilo con etanol por UV-VIS

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de 5-Fluorouracilo y se leyeron las muestras en un espectro de UV-VIS a 275 nm.

SOLUCION MADRE: 5 mg de 5-Fluorouracilo aforado a 10 mL de etanol.

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



ANEXO 4. Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles cargados con CUR.

Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles CAM10/BAAC-CUR.

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

$$x = y - 0.093 / 0.1397$$

$$\text{ABS} = y$$

$$y = 0.338$$

$$\text{Peso total de liofilizado} = 76 \text{ mg}$$

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

$$x = 0.724 - 0.093 / 0.1397 = 82.66 \mu\text{g}$$

Dilución de la muestra leída

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

1 factor de dilución

$$x = 82.66 * 1 = 82.66 \mu\text{g}$$

$$82.66 \mu\text{g} / 1000 = 0.082 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mg} \text{ --- } 0.082$$

$$76 \text{ --- } x \quad x = 6.2821 \text{ mg}$$

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

$$\text{CCF} = 6.2821 / 76 * 100 = 8.26 \%$$

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

$$\text{EC} = 6.2821 / 30 * 100 = 20.94 \%$$

Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles CAM7/BAAC-CUR.

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

$x = y - 0.093 / 0.1397$

ABS = y

y = 1.326

Peso total de liofilizado = 103 mg

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

$x = 1.326 - 0.093 / 0.1397 = 302.2 \mu\text{g}$

Dilución de la muestra leída

Dilución = Disolvente / Muestra

1 factor de dilución

$x = 302.2 * 1 = 302.2 \mu\text{g}$

$302.2 \mu\text{g} / 1000 = 0.3022 \text{ mg}$

1 mg --- 0.3022

103 --- x x = 31.12 mg

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

$\text{CCF} = 31.12 / 103 * 100 = 30.22 \%$

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

$\text{EC} = 31.12 / 30 * 100 = 29.12 \%$

ANEXO 5. Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles cargados con 5-FU.

Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles CAM10/BAAC-5-FU.

Ecuación de la recta $y = 0.0438x - 0.0444$

$x = y - 0.0438 / 0.0444$

ABS = y

y = 1.491

Peso total de liofilizado = 37 mg

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

$x = 1.491 - 0.0438 / 0.0444 = 0.03982 \mu\text{g}$

Dilución de la muestra leída

Dilución = Disolvente / Muestra

1 factor de dilución

$x = 39.8218 * 1 = 39.8218 \mu\text{g}$

$39.8218 \mu\text{g} / 1000 = .0398 \text{ mg}$

1 mg --- 0.0398

37 --- x x = 1.4733 mg

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

$\text{CCF} = 1.4733 / 37 * 100 = 3.98 \%$

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

$\text{EC} = 1.4733 / 30 * 100 = 4.91 \%$

Capacidad de carga y eficiencia de carga para Nanogeles CAM7/BAAC-5-FU

Ecuación de la recta $y = 0.0438x - 0.0444$

$x = y - 0.0438 / 0.0444$

ABS = y

$y = 1.825$

Peso total de liofilizado = 81 mg

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

$x = 1.825 - 0.0438 / 0.0444 = 0.0432 \mu\text{g}$

Dilución de la muestra leída

Dilución = Disolvente / Muestra

1 factor de dilución

$x = 48.3206 * 1 = 48.3206 \mu\text{g}$

$48.3206 \mu\text{g} / 1000 = 0.04832 \text{ mg}$

1 mg --- .04832

81 --- x $x = 3.9123 \text{ mg}$

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

$\text{CCF} = 3.9123 / 81 * 100 = 4.83 \%$

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

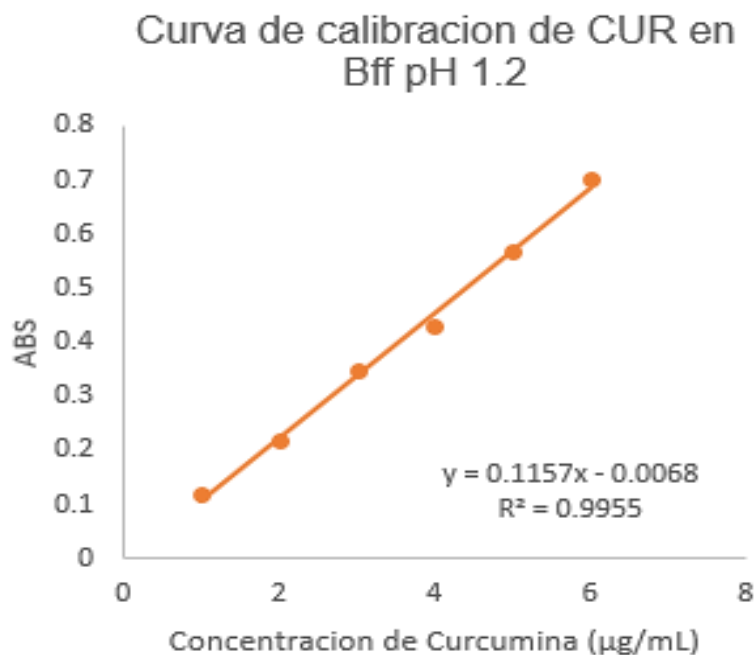
$\text{EC} = 3.9123 / 30 * 100 = 13.04 \%$

ANEXO 6. Curvas de Calibración para liberación de Curcumina

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

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

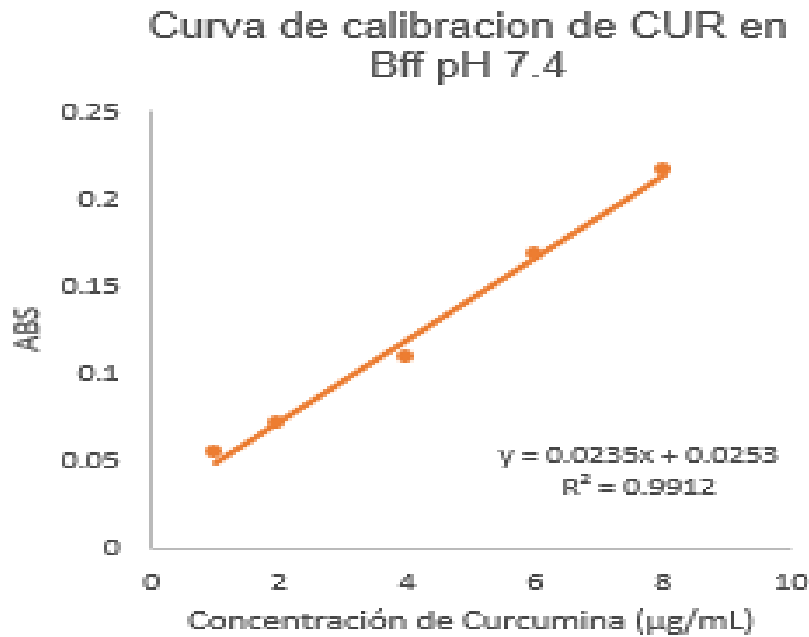
SOLUCION MADRE: 10 mg de Curcumina aforado a 10 mL de metanol.



		Concentración (µg/mL)	ABS 427 nm
A	10 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	1	0.118
B	20 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	2	0.220
C	30 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	3	0.349
D	40 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	4	0.431
E	50 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	5	0.567
F	60 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	6	0.703

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

SOLUCION MADRE: 10 mg de Curcumina aforado a 10 mL de metanol.



		Concentración (µg/mL)	ABS 427 nm
A	10 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	1	0.055
B	20 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	2	0.071
C	40 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	4	0.109
D	60 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	6	0.169
E	80 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	8	0.216

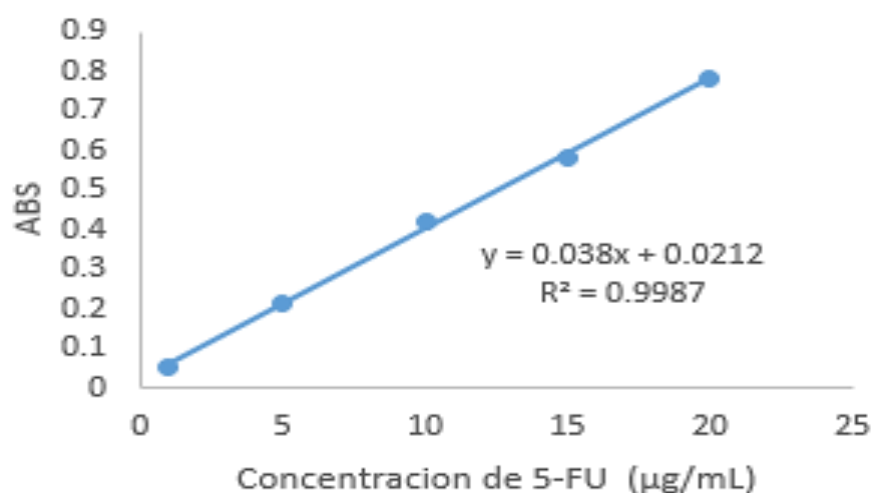
ANEXO 7. Curvas de Calibración para liberación de 5-FU

Curva de calibración para liberación en buffer pH 1.2

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

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

Curva de calibración de 5-FU en
Bff pH 1.2

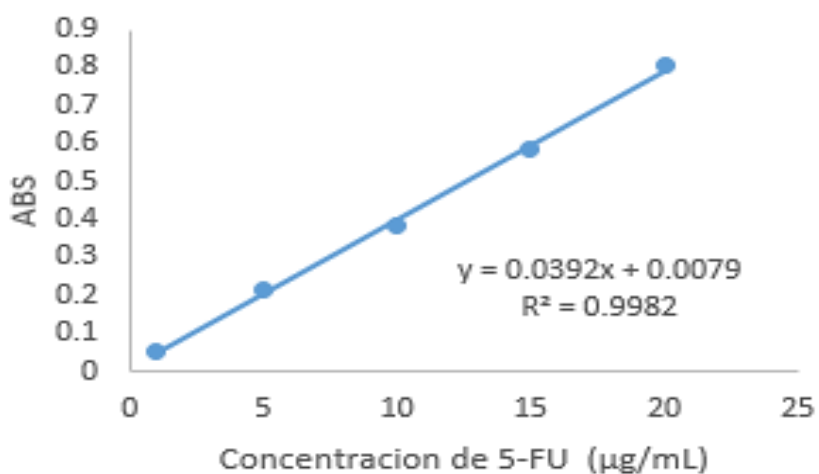


		Concentración (µg/mL)	ABS
A	10 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	1	0.050
B	50 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	5	0.215
C	100 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	10	0.417
D	150 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	15	0.583
E	200 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 1.2	20	0.779

Curva de calibración para liberación en buffer pH 7.4

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

Curva de calibración de 5-FU en
Bff pH 7.4



		Concentración (µg/mL)	ABS
A	10 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	1	0.052
B	50 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	5	0.212
C	100 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	10	0.382
D	150 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	15	0.587
E	200 µL sln madre/ 10 mL buffer pH 7.4	20	0.804

ANEXO 8. Fracciones liberadas de CUR a diferentes pH.

Tiempo (Hrs)	CUR Fracción Liberada a pH 1.2				Fracción Liberada
	0	0	0	0	0
0.5	0.0238	0.1465	0.5	0.04	1.3333
0.75	0.0244	0.1525	0.75	0.09	12.444
1	0.0268	0.1736	1	0.1093	16.74
2	0.02766	0.1803	2	0.1122	17.38
4	0.0281	0.1841	4	0.1309	21.53
8	0.0324	0.2216	8	0.1582	27.60
12	0.035	0.2437	12	0.2254	42.54
24	0.0423	0.301	24	0.2346	44.56
36	0.0478	0.3551	36	0.1669	29.532
48	0.0508	0.3810	48	0.153	26.44

Tiempo (Hts)	CUR Fracción Liberada a pH 7.4				Fracción Liberada
	0	0	0	0	0
0.5	0.04	1.333	4	4	0.004
0.75	0.09	12.444	37.33	41.33	0.0413
1	0.13	16.407	50.22	91.55	0.0916
2	0.12	17.316	52.14	143.74	0.1437
4	0.19	21.642	64.59	208.296	0.2063
8	0.22	27.383	82.81	291.11	0.2911
12	0.24	42.209	127.62	418.71	0.9
24	0.68	44.562	133.70	552.44	0.5544
36	0.19	29.542	88.59	641.37	0.6404
48	0.13	26.444	79.33	720.37	0.7207

ANEXO 9. Fracciones liberadas de CAM10/BAAC-CUR a diferentes pH.

Tiempo (Hrs)	CAM10/BAAC-CUR Fracción Liberada a pH 1.2				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.0238	0.14965	0.4496	0.4402	0.0022
0.75	0.0244	0.1525	0.4574	0.8979	0.00772
1	0.0269	0.12912	0.5205	1.4189	0.00861
2	0.0287	0.1808	0.54103	1.9596	0.00967
4	0.0281	0.1844	0.5551	2.5122	0.01224
8	0.0324	0.2212	0.6687	3.1775	0.07718
12	0.035	0.2439	0.7318	3.9083	0.00838
24	0.0423	0.3061	0.9211	4.8297	0.00973
36	0.0489	0.3551	1.0602	5.8957	0.00513
48	0.05089	0.3813	1.1464	7.0387	0.00732

Tiempo (Hrs)	CAM10/BAAC-CUR Fracción Liberada a pH 7.4				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.037	0.667	2	2	0.002
0.75	0.08744444	11.876	35.6296	37.6296296	0.03763
1	0.018	3.5555	- 10.66666667	26.962963	0.026
2	0.07844444	9.87621	29.6296296	56.5925926	0.0559
4	0.06844444	7.6543	22.962963	79.5555556	0.076
8	0.05311111	4.24658	12.7407407	92.2962963	0.0923
12	0.08266667	10.81148	32.4444444	124.740741	0.12474
24	0.04766667	3.03704	9.11111111	133.851852	0.13385
36	0.08388889	11.04198	33.2592593	167.111111	0.16711
48	0.11611111	18.24636	54.7407407	221.851852	0.22185

ANEXO 10. Fracciones liberadas de CAM7/BAAC-CUR a diferentes pH.

Tiempo (Hrs)	CAM7/BAAC-CUR Fracción Liberada a pH 1.2				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.01144444	0.04014213	0.12042639	0.12042639	0.00012043
0.75	0.01277778	0.05166619	0.154998559	0.27542495	0.00027542
1	0.01277778	0.05166619	0.154998559	0.43042351	0.00043042
2	0.016	0.07951599	0.238547969	0.66897148	0.00066897
4	0.01022222	0.02957841	0.088735235	0.75770671	0.00075771
8	0.01066667	0.03341976	0.100259291	0.857966	0.00085797
12	0.06022222	0.46173053	1.385191587	2.24315759	0.00224316
24	0.09666667	0.77672141	2.330164218	4.57332181	0.00457332
36	0.09811111	0.7892058	2.367617401	6.94093921	0.00694094
48	0.10633333	0.86027082	2.580812446	9.52175166	0.00952175

Tiempo (Hrs)	CAM7/BAAC-CUR Fracción Liberada a pH 7.4				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.12744444	20.7654321	62.2962963	62.2962963	0.0622963
0.75	0.06744444	7.43209877	22.2962963	84.59259259	0.08459259
1	0.05966667	5.7037037	17.11111111	101.7037037	0.1017037
2	0.03833333	0.96296296	2.88888889	104.5925926	0.10459259
4	0.08344444	10.9876543	32.962963	137.5555556	0.13755556
8	0.03844444	0.98765432	2.96296296	140.5185185	0.14051852
12	0.08555556	11.4567901	34.3703704	174.8888889	0.17488889
24	0.121	19.33333333	58	232.8888889	0.23288889
36	0.15866667	27.7037037	83.11111111	316	0.316
48	0.13266667	21.9259259	65.7777778	381.777778	0.38177778

ANEXO 11. Fracciones liberadas de 5-FU a diferentes pH.

Tiempo (Hrs)	5-FU Fracción Liberada a pH 1.2				Fracción Liberada
	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0
0.5	0.59744444	15.1643275	45.49298246	45.4929825	0.04549298
0.75	1.11455556	28.7725146	86.31754386	131.810526	0.13181053
1	1.72011111	44.7081871	134.1245614	265.935088	0.26593509
2	2.47444444	64.5590643	193.677193	459.612281	0.45961228
4	2.78111111	72.6292398	217.8877193	677.5	0.6775
8	2.86388889	74.8076023	224.422807	901.922807	0.90192281
12	2.86677778	74.8836257	224.6508772	1126.57368	1.12657368
24	2.87466667	75.0912281	225.2736842	1351.84737	1.35184737
36	2.87944444	75.2169591	225.6508772	1577.49825	1.57749825
48	2.88866667	75.4596491	226.3789474	1803.87719	1.80387719

Tiempo (Hrs)	5-FU Fracción Liberada a pH 7.4				Fracción Liberada
	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0
0.5	1.20111111	30.439059	91.3171769	91.3171769	0.0517697
0.75	1.69277778	42.981576	128.944728	220.261905	0.12487129
1	1.72844444	43.8914399	131.67432	351.936224	0.19952033
2	2.6	66.125	198.375	550.311224	0.31198346
4	2.60655556	66.2922336	198.876701	749.187925	0.424731
8	2.611	66.4056122	199.216837	948.404762	0.53767138
12	2.61188889	66.428288	199.284864	1147.68963	0.65065032
24	2.65844444	67.6159297	202.847789	1350.53741	0.76564916
36	2.704	68.7780612	206.334184	1556.8716	0.88262452
48	2.71322222	69.013322	207.039966	1763.91156	1

ANEXO 12. Fracciones liberadas de CAM10/BAAC-5-FU a diferentes pH.

Tiempo (Hrs)	CAM10/BAAC-5-FU Fracción Liberada a pH 1.2				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.52116667	13.1570175	39.4710526	39.4710526	0.03947105
0.75	0.641	16.3105263	48.9315789	88.4026316	0.08840263
1	0.72433333	18.5035088	55.5105263	143.913158	0.14391316
2	1.14133333	29.477193	88.4315789	232.344737	0.23234474
4	1.31633333	34.0824561	102.247368	334.592105	0.33459211
8	1.392	36.0736842	108.221053	442.813158	0.44281316
12	1.446	37.4947368	112.484211	555.297368	0.55529737
24	1.45583333	37.7535088	113.260526	668.557895	0.66855789
36	1.47016667	38.1307018	114.392105	782.95	0.78295
48	1.47433333	38.2403509	114.721053	897.671053	0.89767105

Tiempo (Hrs)	CAM10/BAAC-5-FU Fracción Liberada a pH 7.4				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.20477778	5.02239229	15.0671769	15.0671769	0.01506718
0.75	0.20044444	4.91184807	14.7355442	29.8027211	0.02980272
1	0.30633333	7.61309524	22.8392857	52.6420068	0.05264201
2	0.33133333	8.25085034	24.752551	77.3945578	0.07739456
4	0.45922222	11.513322	34.539966	111.934524	0.11193452
8	0.47688889	11.9640023	35.8920068	147.826531	0.14782653
12	0.49688889	12.4742063	37.422619	185.24915	0.18524915
24	0.56255556	14.1493764	42.4481293	227.697279	0.22769728
36	0.55633333	13.9906463	41.9719388	269.669218	0.26966922
48	0.51422222	12.9163832	38.7491497	308.418367	0.30841837

ANEXO 13. Fracciones liberadas de CAM7/BAAC-5-FU a diferentes pH.

Tiempo (Hrs)	CAM7/BAAC-5-FU Fracción Liberada a pH 1.2				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.38777776	9.64678316	28.9403495	28.9403495	0.02894035
0.75	0.40888888	10.2023389	30.6070168	59.5473663	0.05954737
1	0.41223222	10.2903216	30.8709647	90.4183311	0.09041833
2	0.42111111	10.5239766	31.5719297	121.990261	0.12199026
4	0.42444444	10.6116958	31.8350874	153.825348	0.15382535
8	0.45588889	11.4391813	34.3175439	188.142892	0.18814289
12	0.46066667	11.5649123	34.6947368	222.837629	0.22283763
24	0.47177778	11.8573099	35.5719298	258.409559	0.25840956
36	0.47488889	11.9391813	35.8175439	294.227103	0.2942271
48	0.54866667	13.8807018	41.6421053	335.869208	0.33586921

Tiempo (Hrs)	CAM7/BAAC-5-FU Fracción Liberada a pH 7.4				Fracción Liberada
0	0	0	0	0	0
0.5	0.22155556	5.45039683	16.3511905	16.3511905	0.01635119
0.75	0.22944444	5.65164399	16.954932	33.3061224	0.03330612
1	0.31377778	7.80300454	23.4090136	56.7151361	0.05671514
2	0.32433333	8.07227891	24.2168367	80.9319728	0.08093197
4	0.40688889	10.178288	30.5348639	111.466837	0.11146684
8	0.21931429	5.39322157	16.1796647	127.646501	0.1276465
12	0.44811111	11.2298753	33.6896259	161.336127	0.16133613
24	0.47277778	11.859127	35.577381	196.913508	0.19691351
36	0.41966667	10.5042517	31.5127551	228.426263	0.22842626
48	0.40744444	10.1924603	30.577381	259.003644	0.25900364