



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAestrÍA EN CIENCIAS

(MYDCI)

“HIDROGELES MICROESTRUCTURADOS SENSIBLES A LA TEMPERATURA Y AL  
PH PARA LA LIBERACION DE PROTEÍNAS”

PRESENTA:

Q.F.B. FELISA PAULA OSORIO RIVERA

DIRECTOR:

DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

CO-DIRECCIÓN:

DRA. KENIA PALOMINO VÍZCAINO

TIJUANA B.C. DICIEMBRE 2022

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

Folio No.335  
Tijuana, B.C., a 15 de noviembre del 2022

C. Felisa Paula Osorio Rivera  
Pasante de: Maestría en Ciencias  
Presente

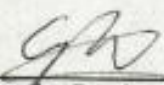
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS


Es propuesto, por los C. Dr. Juan Manuel Cornejo Bravo y  
Dra. Kenia Palomino Vizcaino

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente,  
referido al tema "Hidrogeles Microestructurados Sensibles A La Temperatura Y  
Al pH Para La Liberación De Proteínas"

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

- I. INTRODUCCIÓN
- II. TEORIA GENERAL
- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS
- V. CONCLUSIONES
- VI. ANEXOS


  
Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez  
Sub-Directora

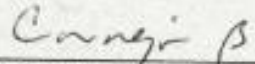
  
M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez  
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA  
COORDINACIÓN DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

  
Dra. Kenia Palomino Vizcaino  
Co - Directora de Tesis

  
Dr. José Manuel Cornejo Bravo  
Director de Tesis

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁG.</b>
Hoja de aprobación	2
Índice	3
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Vita y área de estudio	7
Lista de tablas	8
Lista de figuras	8
Resumen	9
<b>Capítulo I</b>	<b>10</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
1.1 Antecedentes	15
1.2 Justificación	18
1.3 Objetivo general	18
1.4 Objetivos específicos	18
1.5 Hipótesis	19
<b>Capítulo II</b>	<b>21</b>
<b>Teoría general</b>	<b>22</b>
2.1 Polímeros	22
2.1.1 Polimerización	22
2.1.2 Copolímeros	23
2.1.3 Entrecruzamiento	24
2.2 Entrecruzantes	24
2.3 Iniciadores	26
2.4 Ac. Metacrililoamido hexanoico (PCAM5)	27
2.5 Poli (N- isopropil acrilamida) NIPAAm	27
2.6 N, N-Dimetilacrilamida	28
2.7 Microgeles	28
2.8 Hidrogeles como sistemas de liberación inteligente	29
<b>Capítulo III</b>	<b>31</b>
<b>Parte experimental</b>	<b>32</b>
3.1 Síntesis del monómero Ac. Metacrililoamido hexanoico (PCAM5)	32
3.2 Cromatografía en capa fina	33
3.3 Caracterización con resonancia magnética nuclear	33
3.4 Caracterización por espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	33
3.5 Síntesis de Microgeles de PNIPAAm con PCAM5	34
3.6 Caracterización por dispersión de luz dinámica (DLS)	34
3.7 Síntesis de hidrogel microestructurado.	35
3.8 Grado de hinchamiento con hidrogeles de PNIPAAm/DMA como pruebas blanco	35
3.9 Cinética de hinchamiento	36
3.10 Cinética de colapso	36
3.11 Ciclos de hinchamiento-colapso	37
3.12 Microscopias de microscopio electrónico de barrido de emisiones de campo (FESEM)	37
3.13 Etiquetado de Albumina con fluoresceína	38
3.14 Cargado de hidrogel microestructurado con Albumina-FITC	39
3.15 Liberaciones de Albumina-FITC	40
<b>Capítulo IV</b>	<b>41</b>
<b>Resultados</b>	<b>42</b>
4.1 Síntesis de monómero Ac. Metacrililoamido hexanoico	42
4.2 Caracterización con resonancia magnética nuclear	42
4.3 Síntesis de Microgeles de PNIPAAm con Ac. metacrililoamido hexanoico	43

4.4	Caracterización por dispersión de luz dinámica (DLS)	44
4.5	Caracterización por espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	46
4.6	Microscopias de microscopio electrónico de barrido de emisiones de campo (FESEM)	47
4.7	Síntesis de hidrogeles de PNIPAAm/DMA como pruebas blanco.	49
4.8	Síntesis de hidrogel microestructurado	53
4.9	Cinéticas de hinchamiento	54
4.10	Cinética de colapso	54
4.11	Ciclos de hinchamiento-colapso	57
4.12	Microscopia electrónica de barrido	59
4.13	Etiquetado de Albumina-FITC	61
4.14	Cargado de los hidrogeles microestructurados con Albumina-FITC	62
4.15	Liberación de Albumina-FITC	62
	Conclusiones	63
	Referencias	64
<b>Capítulo V</b>		64
<b>Anexos</b>		65
5.1	Curva de calibración	65

## **Dedicatoria**

El presente trabajo se lo dedico a mis padres, a mi pareja y a mis amigos que han sido de gran apoyo en el desempeño de mi formación. Siempre estuvieron presentes en buenos y malos momentos haciéndome saber que podía contar con ellos, brindándome consejos y herramientas de trabajo que al final sirvieron tanto como para llevar a cabo este proyecto como para mejorar mi crecimiento personal.

## **Agradecimientos**

Me encuentro muy agradecida con mi director de tesis, el Dr. José Manuel Cornejo Bravo, con mi codirectora de tesis la Dra. Kenia Palomino y con la Dra. Aracely Serrano, por haberme dado la confianza para realizar este proyecto, por guiarme y transferirme su conocimiento. Sobre todo, estoy muy agradecida por su hospitalidad, paciencia y apoyo. Encuentro muy agradable el hecho de estar rodeada de personas que son un modelo por seguir.

## **Agradecimientos institucionales**

Además, agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California, que desde mi comienzo en esta institución ha marcado una gran mejora en mi camino.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo en mi formación como investigador científico brindándome los recursos para subir mi nivel académico y así mismo mi crecimiento personal.

## **Vita y área de estudio**

Felisa Paula Osorio Rivera, nació el 22 de agosto de 1993 en Tijuana, Baja California. Hija única del matrimonio del Sr. Pablo Osorio López y la Sra. Felisa de Jesus Rivera Ramos. Desde pequeña demostró tener interés en el área de las ciencias de la salud, por lo que la animo a cursar sus estudios del Bachillerato en la Preparatoria Federal Lázaro Cárdenas la cual oferta la carrera técnica de Laboratorista Clínico. Una vez con el título de técnico Laboratorista decide inscribirse en la licenciatura de Químico Farmacobiólogo. En el 2013 ingresa a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California en la cual tiene una participación en el congreso de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C. (AMIMC) con el proyecto “Estudio retrospectivo de prevalencia de patógenos multirresistentes en infecciones urinarias en pacientes hospitalizados”, Puebla, 2017. Después de la conclusión de las prácticas profesionales llevadas a cabo en el Hospital General de Tijuana el interés en el área de farmacia comienza. Además de trabajar en ese momento en un laboratorio de soluciones inyectables se da cuenta que necesita un crecimiento académico para desarrollar más sus habilidades farmacéuticas. En diciembre del 2017 adquiere su título y cedula profesional de Química farmacobióloga

En el 2020 se inscribe en el programa de posgrado “Maestría en Ciencias” de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería en el cual se desarrolla como farmacéutica.

Contacto: paula.osorio@uabc.edu.mx

Áreas de estudio: farmacología, biofarmacia, sistemas de liberación farmacéutica, farmacia intrahospitalaria.

## LISTA DE FIGURAS

NO.	FIGURA	PÁG
1	Figura 1. Esquema propuesto para el cargado y liberación de hidrogeles nanoestructurados sensibles a la temperatura y el pH. Izquierda: Cargado de hidrogel microestructurado con proteína en pH 5 a 33 °C. Centro: hidrogel sin liberar proteína a 37 °C y pH 7.4, Derecha: Liberación de proteína a pH 7.4 y 42 °C.	20
2	Tipos de estructura polimérica.	22
3	Moléculas de entrecruzantes.	25
4	Molécula de poli (N-isopropil acrilamida) (NIPAAm).	27
5	Estructura molecular de N, N-Dimetilacrilamida (DMA).	
6	Reacción Schotten-Baumann para la síntesis de ácido metacrililamido hexanoico.	32
7	Resultado de la síntesis del ácido metacrililamido hexanoico.	42
8	RMN del ácido metacrililamido hexanoico (CAM5).	42
9	Microgeles de PNIPAAm con ácido metacrililamido hexanoico.	44
10	“Trend” de tamaño contra temperatura de los microgeles NIPAAm-PCAM5 en pH 7.5 (a) y pH 5 (b). Mediante dispersión de luz dinámica (DLS) se midió el diámetro de las micropartículas en un rango de temperatura desde los 20 °C hasta los 50 °C.	44
11	Espectro infrarrojo de los (C) microgeles de PNIPAAm/M5 comparando el espectro de (A) PNIPAAm solo y el monómero del (B) ácido metacrililamido hexanoico.	47
12	Micrografía FESEM de los microgeles de PNIPAAm/CAM5. x30,000	48
13	Micrografía FESEM de los microgeles de PNIPAAm/CAM5. x80,000	48
14	Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm a 33°C.	49
15	Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm/DMA 33°C.	50
16	Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm a 37°C.	50
17	Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm/DMA a 37°C.	51
18	Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm a 42°C.	51
19	Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm/DMA a 42°C.	52
20	Hidrogel microestructurado cortado en forma de disco con 1cm de diámetro.	53
21	Grado de hinchamiento de los hidrogeles microestructurados al 15% a 42 °C. Donde los hidrogeles son (A) Hidrogel microestructurado a pH 5, (B) Hidrogel no microestructurado a pH 5, (C) Hidrogel microestructurado a pH 7.4, (D) Hidrogel no microestructurado a pH 7.4.	55
22	Grado de hinchamiento de los hidrogeles microestructurados al 30% a 42 °C. Donde los hidrogeles son (A) Hidrogel microestructurado a pH 5, (B)	56

	Hidrogel no microestructurado a pH 5 (C) Hidrogel microestructurado a pH 7.4 (D) Hidrogel no microestructurado a pH 7.4	
23	Micrografía FESEM de un hidrogel de PNIPAAm/DMA microestructurado con micropartículas de PNIPAAm/M5. x1,000.	59
24	Micrografía FESEM de un hidrogel de PNIPAAm/DMA microestructurado con micropartículas de PNIPAAm/M5. X5,500.	59
25	Cargado de los hidrogeles microestructurados al 30% con albumina-FITC en pH 5 y pH 7.4 a 33°C.	61
26	Fracción liberada de albumina a 37 °C, de los cuales los hidrogeles señalados como H5, 56, H7 corresponden al cargado con pH 5 y los hidrogeles señalados como H8, H9, H10 corresponden a los hidrogeles cargados con pH 7.4	62
27	Fracción liberada de albumina a 42 °C, de los cuales los hidrogeles señalados como H5, 56, H7 corresponden al cargado con pH 5 y los hidrogeles señalados como H8, H9, H10 corresponden a los hidrogeles cargados con pH 7.4	62
28	Curva de calibración de albumina-FITC	65

## LISTA DE TABLAS

NO.	TABLA	PÁG
1	Tamaño de Microgeles frente a 20 °C a 50 °C.	47
2	Peso en gramos de los hidrogeles en dos ciclos de cinéticas de hinchamiento-colapso a pH 7.4 en temperaturas de 42 °C a 25 °C.	59
3	Datos del marcado de albumina con fluoresceína FITC.	63

## RESUMEN

Se prepararon hidrogeles de PNIPAAm/DMA microestructurados con PNIPAAm/PCAM5 para la liberación de proteínas ajustando el pH a 5 y a 7.4 y la temperatura a 33 °C, 37 °C y 42 °C con la intención de contribuir a mejorar la terapia farmacológica en la liberación controlada de proteínas para aumentar la biodisponibilidad en cada administración.

Se sintetizó el monómero ácido metacrililamido hexanoico (PCAM5) y se caracterizó por medio de resonancia magnética nuclear, espectro infrarrojo y cromatografía en capa fina. Una vez obtenido el monómero se prepararon microgeles con NIPAAm y PCAM5 sensibles a la temperatura y al pH, a una temperatura de transición por arriba de los 37 °C en pH 5 y 7.4. Estos fueron caracterizados por DLS, espectro infrarrojo y FESEM. En seguida se sintetizó un hidrogel de PNIPAAm/DMA microestructurado con los microgeles de NIPAAm y PCAM5 comprobando con las cinéticas de hinchamiento la capacidad del hidrogel para hinchar y colapsar en base a los parámetros establecidos de manera que pudieron ser cargados de albumina etiquetada con fluoresceína y permitió estudiar la cinética de liberación en respuesta a pH y a temperatura obteniendo como conclusión que los hidrogeles microestructurados con microgeles al 30% responden a estímulos como temperatura de 42 °C en pH 5 y pH 7.4 cargando proteína en sus poros a 33 °C pero con dificultad para liberar de forma controlada ya que comienza a liberarse en 37 °C.

## CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Los biomateriales y la nanotecnología son innovaciones en los sistemas de liberación de fármacos que han creado mejoras en los tratamientos farmacológicos, y por consecuencia, progreso en la calidad de vida de los pacientes. Con la propuesta del uso de nanotecnología, que gracias a sus propiedades pueden interactuar con los biomateriales, se pueden adaptar a la biocompatibilidad, biodegradación, propiedades mecánicas, hidrofiliidad, respuesta química y biológica a estímulos externos. Existen varios enfoques en los biomateriales compuestos de polímeros, los cuales pueden ser diseñados para obtener propiedades deseadas y una estructura funcional capaces de imitar sistemas fisiológicos desarrollando áreas como la ingeniería de tejidos, ingeniería de modelos tumorales, diseño de matrices extracelulares y sistemas inteligentes para la liberación de fármacos, por mencionar algunos. (Zhou et al., 2017; Khan et al 2017).

Las investigaciones se han centrado en materiales inteligentes sensibles al pH y a la temperatura como portadores de administración de fármacos, antibióticos, proteínas y ADN a las células. Estos polímeros inteligentes sensibles al calor son derivados a partir de polisacáridos, proteínas o de origen sintético, que posibilitan en el sistema del biomaterial que las cadenas de copolímero tengan la capacidad de organizarse por sí mismas en la fase acuosa a través de interacciones intramoleculares o intermoleculares, formando diversidad estructural y provocando que factores externos puedan influir en cambios deseados, como lo es el hinchamiento del hidrogel, puesto que las respuestas a estímulos externos dependen de la cantidad de copolímero agregado, de entrecruzante y del método de preparación. Esta particularidad podría permitir lograr propiedades deseadas tales como porosidad, proporción del hinchamiento, biodegradabilidad y

propiedades mecánicas, ajustando varios parámetros en el proceso. (Liu et al., 2014; Khan et al., 2017). Es bien sabido que existen algunas variaciones en el pH de varios sitios del cuerpo y compartimentos celulares, como el tracto gastrointestinal, la vagina y los microambientes extracelulares y endosomales/lisosomales, intestino y piel. Además, el pH existente del tejido tumoral ha sido considerado un disparador ideal para la liberación selectiva de medicamentos contra el cáncer en tejidos tumorales o dentro de las células tumorales comparado con el pH extracelular de tejidos y sangre normal. (G. Kocak et al., 2017).

Como el hidrogel tiene una alta capacidad para absorber agua y no ser disuelto, favorece el cargado de la sustancia deseada, este llega a absorber agua hasta mil veces su peso seco. Para construir un hidrogel inteligente se utiliza la poli(N-isopoliacrilamida) en virtud de ser uno de los materiales termosensibles más estudiado, presenta una transición de hinchamiento-colapso cuando la temperatura aumenta por encima de su temperatura de transición ( $T_{tr}$  32°C). Esta temperatura puede ajustarse por encima de la temperatura corporal mediante copolimerizaciones con monómeros hidrófilos o ionizables y un entrecruzante para crear una red tridimensional, ya sea con enlaces covalentes, puentes de hidrogeno o interacciones de Van der Waals. (Xu et al., 2019). La poli(N-isopoliacrilamida) se polimerizará con N, N-dimetilacrilamida para el hidrogel y para los microgeles será poli(N-isopoliacrilamida) con un ácido amfífilico, el ácido metacriloilamido hexanoico, este ayudará a modificar la temperatura de transición, ya que depende del número de metilenos en la cadena lateral del ácido y la proporción utilizada. Es gracias a estas propiedades que los polímeros tienen aplicaciones biomédicas, además que los hidrogeles convencionales suelen formar una capa similar

a la de la piel en la superficie que limita una respuesta rápida a la transición de hinchamiento-colapso, pero debido a la combinación de estos, en la incorporación de nano o microgeles que generan poros en el hidrogel se produce una contracción más rápida y sus propiedades mecánicas incrementan. (Palomino et al., 2015; Cornejo et al., 2020).

Este hidrogel tendrá una matriz tridimensional porosa conformada por poli(N-isopoliacrilamida), y N-dimetilacrilamida (DMA) formulada con diferentes proporciones para ajustarlo a una temperatura de transición por encima de la temperatura corporal incorporando microgeles de (ácido metacriloilamido hexanoico-co-N-isopoliacrilamida), que, de igual manera, serán probadas diferentes proporciones para ajustar a la temperatura deseada. El DMA es un copolímero hidrofílico que reacciona cuando la temperatura de transición de la NIPAAm aumenta ( $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y genera que el hidrogel se encoja, ayudándonos a obtener una liberación positiva. Se busca que los microgeles respondan primero a un pH de 5 y a una temperatura de  $33^{\circ}\text{C}$ , encogiéndose y generando poros en la cual entrará la proteína para ser cargada, después a un pH de 7.4 y a  $37^{\circ}\text{C}$  el microgel se hincha y cierra los poros, impidiendo que la proteína ya cargada se libere, y posteriormente se aumenta la temperatura a  $42^{\circ}\text{C}$  para que el hidrogel microestructurado se encoja y el microgel también y así libere a la proteína cargada, imitando un efecto similar al de una esponja. El cambio en la temperatura simulará la temperatura corporal cuando esta es afectada por una patología, como se presenta en una fiebre o en la temperatura de una zona tumoral, y la aplicación de la respuesta al pH con la finalidad de dirigir la proteína a la zona de administración y obtener una liberación específica. (Palomino et al., 2019)

¿Por qué se busca crear este sistema inteligente para liberar proteínas?

La estabilidad química y física de las proteínas puede verse comprometida por factores externos durante su administración ocasionando desventajas como: baja biodisponibilidad, alto peso molecular, desnaturalización de la proteína, presentar alta inmunogenicidad, degradaciones biológicas y enzimáticas. Específicamente problemas con la administración vía oral, aun siendo la más utilizada para administrar fármacos de bajo peso molecular, no es la vía más factible para macromoléculas. La poca estabilidad de las proteínas en el tracto gastrointestinal y la baja permeabilidad a través de las membranas biológicas debido al alto peso molecular y de la superficie polar de las proteínas implica que sean administradas por vía parenteral; sin embargo, se están buscando otras vías de administración alternas como la vía nasal y la pulmonar, no obstante, es baja e insuficiente para un efecto sistémico eficaz. Los obstáculos para la absorción eficiente se pueden clasificar en términos generales como barreras enzimáticas que encuentra la proteína al moverse del sitio administrado al sitio de acción, o barreras físicas para el transporte efectivo, como los revestimientos de células epiteliales y endoteliales. (Frokjaer et al., 2005).

Las propiedades farmacocinéticas de las proteínas pueden mejorar mediante la modificación química, mutagénesis (análogos de la proteína) o diseño de sistemas específicos de administración de fármacos, pero siempre con el cuidado de no reducir su efecto. Los sistemas más populares son el atrapamiento y encapsulado de proteínas adaptados a polímeros como los hidrogeles, conjugados de polímero proteína, nano cápsulas y microesferas. (Frokjaer et al., 2005)

Se busca aportar a las investigaciones diseñando un hidrogel inteligente microestructurado, con efecto de contracción rápida respondiendo a un estímulo externo para la liberación de proteínas con el fin de garantizar tratamientos farmacológicos eficaces con macromoléculas en un futuro próximo.

### **1.1 Antecedentes.**

En la Universidad Autónoma de Baja California se realizó el trabajo de hidrogeles microestructurados con modulación en la temperatura de transición para liberación controlada positiva; En el cual se preparó, con diferentes proporciones, microgeles de NIPAAm por copolimerización con acrilamida y dimetilacrilamida por separado para producir hidrogeles porosos y modular su temperatura y compararlos. Primero se sintetizaron los MGs por polimerización en dispersión combinando las diferentes proporciones de NIPAAm/AAm y NIPAAm/DMA. Luego se sintetizó el hidrogel, y de la misma forma se combinó NIPAAm/AAm y NIPAAm/DMA. A esta preparación se le agregaron los MGs. Se encontró que los hidrogeles microestructurados presentan una respuesta a la temperatura más rápida que la de los hidrogeles convencionales. Los MGs que contenían DMA eran más pequeños observando que estos se reducían en tamaño entre más contenido de DMA tenían. De acuerdo con la respuesta de hinchamiento y a una comparación de proporciones y cambios en la temperatura se escogió el hidrogel con NIPAAm/DMA (80:20), este se preparó de modo microestructurado agregándole MG de NIPAAm 15% sobre su peso de dos composiciones diferentes, el de NIPAAm/AAm (80:20) y NIPAAm/AAm (85:15). Estos hidrogeles microestructurados presentaron una transición continua en el mismo grado de hinchamiento y además presentaron una respuesta rápida. Se realizó un estudio de cinética de hinchamiento/encogimiento

pesando los hidrogeles microestructurados cada 15 minutos y ciclando la temperatura desde 25 °C a 42 °C y de 37 °C a 42 °C. Cada temperatura se mantuvo por una hora, debido a que respondían rápido al encogimiento el proceso pudo ser reversible en los dos casos. Para aplicarlo en cargado de un fármaco se probó con vitamina B12 y con citocromo C a 4 °C. El hidrogel con NIPAAm/AAm (85:15) cargo más cantidad de vitamina B12 y de citocromo C. La vitamina B12 se liberó a temperatura de 25 °C a 42 °C, un 70% en la primera hora. Se hizo un estudio similar con el citocromo C y este obtuvo una menor liberación, se cree que fue porque es una molécula que tiene mayor tamaño. (Palomino et al., 2018).

El Dr. José Manuel Cornejo Bravo de la Universidad Autónoma de Baja California realizó el trabajo de “Copolimero de nano/microgeles de N-isopoliacrilamida y carboxialkil metacrilamida: efectos de las cadenas de metileno y el estado de ionización de los ácidos débiles sobre el tamaño y la sensibilidad a pH y temperatura”. En el cual se preparó nano/microgeles por copolimerización precipitada de NIPAAm con cada carboxialkil metacrylamidas en su forma ácida y en su forma de sal potásica NIPAAm-M5, NIPAAm-M7 Y NIPAAm-M10. Con esta composición, los copolímeros pueden ser ajustados a una Ttr deseada combinando diferentes proporciones de comonómeros ácidos y presentan sensibilidad al pH. Para determinar el contenido de ácido y pKa se realizó una valoración ácido base. Dispersando 100mg de nano/MGs en 20mL de agua destilada. Se agrego 0.1M NaOH pH=11 se tituló con 0.05M HCl hasta pH2. Luego se calculó usando los ácidos equivalentes consumidas entre los puntos de inflexión de la curva de titulación. La evaluación de la Ttr, el efecto de la temperatura y el pH sobre el diámetro de los nano/MGs se obtuvo por luz dinámica. Para el M5 se observa un incremento a la Ttr

como del pH probando que la interacción con agua requiere mayor temperatura para romper los puentes de hidrogeno y podemos ver que la temperatura mayor a 37 °C se alcanzó con M5 5%. Se obtuvo que el copolimerizado con la forma ácida de los carboxialkil metacrilamidas se modifica de Ttr del NIPAAm, dependiendo del número de metilenos en la cadena del ácido en preparar al comonomero usado. El copolímero M5 es de mayor uso para aplicaciones biomédicas por su Ttr ajustable mayor de 37 °C. (Cornejo et al., 2020).

La investigación “Cargado y liberación de un modelo de una proteína de alto peso molecular para hidrogeles microestructurados sensibles a la temperatura” fue realizada en la Universidad Autónoma de Baja California preparando hidrogeles microestructurados termosensibles incorporando microgeles compuestos de NIPAAm en una matriz de hidrogel polimerizado de NIPAAm con DMA sintonizando la Ttr a 40 °C y a los microgeles en 32 °C, de tal manera que se formaran poros en la matriz a 33 °C. Este hidrogel fue cargado con albúmina etiquetada con fluorescencia a 4°C y a 33 °C, pero no se cargó exitosamente a 4 °C, en cambio a 33 °C si porque a esta temperatura sobrepasa la Ttr en la cual los MGs se encogen y al generar poros puede cargar la proteína. Después el hidrogel liberó sostenidamente a la proteína en PBS a pH 7.4 durante 5 horas a 37 °C. Esto nos indica que que la proteína no sufre entrelazamiento dentro del hidrogel microestructurado y puede utilizarse para liberación de macromoléculas. (Palomino et al., 2019).

Es de nuestro interés darle seguimiento a esta investigación, agregando mejoras en los microgeles para una reacción más rápida, fijar temperaturas y adecuar la respuesta a diferentes pH deseados para una liberación en un sitio específico imitando un sitio

fisiológico. De igual manera se busca mejorar la cantidad de cargado, de liberación y que esta sea una liberación pulsada.

## **1.2 Justificación.**

Las proteínas por ser macromoléculas son más sensibles a sufrir cambios en su estructura molecular y a tener impedimento para atravesar barreras fisiológicas, por lo tanto, es más difícil obtener un medicamento no invasivo y eficaz en tratamientos con proteínas que con fármacos. En el mercado los tratamientos proteicos más comunes se encuentran en forma inyectable, y sus presentaciones son de dosis altas, poniendo al paciente en una situación incómoda, además de consecuencias que se pueden presentar como hipervolemia o hemodilución. Debido a esto se busca obtener un material inteligente que funcione como protector para las macromoléculas y a su vez como sistema de liberación pulsada para hacer llegar la dosis en el sitio deseado sin sufrir consecuencias en el transcurso de ser administrado hasta que sea absorbido.

## **1.3 Objetivo general.**

Preparar hidrogeles PNIPAAm con ajuste de la temperatura de transición por arriba de la temperatura de corporal, microestructurados con microgeles de NIPAAm copolimerizadas con ácido amfifílico. Evaluar la aplicación de los materiales preparados como sistemas de liberación de proteínas, controlada (pulsada) por temperatura y pH.

## **1.4 Objetivos específicos.**

Sintetiza el monómero ácido metacriloilamido hexanoico y realizar su caracterización por FITR-IR, TLC y RMN.

- Preparar microgeles con NIPAAm y ácido metacriloilamido hexanoico, sensibles a la temperatura y el pH con una temperatura de transición por arriba de la fisiológica a pH 7.4 y pH 5.
- Caracterizar los microgeles por medio de DLS, FITR-IR y FESEM
- Preparar hidrogeles microestructurados de NIPAAm/DMA con los microgeles, sensibles a la temperatura con temperatura de transición arriba de la fisiológica.
- Marcar la proteína albúmina con fluoresceína.
- Cargar albumina en los hidrogeles microestructurados.
- Estudiar la cinética de liberación en respuesta al pH y la temperatura.

### **1.5 Hipótesis.**

Es posible sintetizar hidrogeles de NIPAAm co-DMA microestructurados con microparticulas de PCAM 5 co-NIPAAm que sean capaces de controlar la liberación pulsada de proteínas mediante estímulos fisiológicos, como lo son, temperatura y pH para el mejoramiento en la biodisponibilidad del tratamiento farmacológico con proteínas.

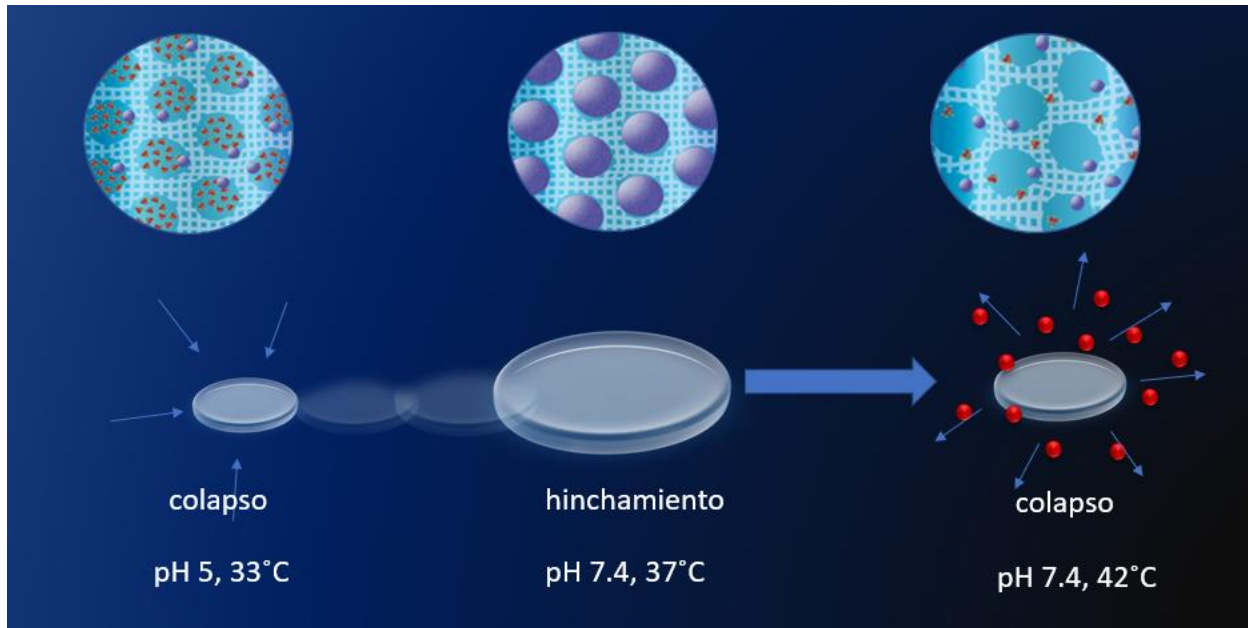


Figura 1. Esquema propuesto para el cargado y liberación de hidrogeles nanoestructurados sensibles a la temperatura y el pH. Izquierda: Cargado de hidrogel microestructurado con proteína en pH 5 a 33 °C. Centro: hidrogel sin liberar proteína a 37 °C y pH 7.4, Derecha: Liberación de proteína a pH 7.4 y 42 °C.

## CAPÍTULO II

# TEORÍA GENERAL

## 2.1 Polímeros

Un polímero se forma cuando una larga cadena de unidades estructurales llamadas monómeros se unen por medio de enlaces covalentes bajo condiciones apropiadas. Una molécula puede clasificarse como monofuncional, bifuncional o polifuncional dependiendo si tiene uno, dos o más sitios disponibles para unirse con otras moléculas. La unidad estructural resultante de la reacción de monómeros puede estar unida en cualquier patrón. Esto significa que la secuencia entre unidades bifuncionales sería una estructura lineal. La reacción entre moléculas polifuncionales resulta en estructuras no lineales. En algunos casos el extremo de cada cadena de polímero puede estar terminada antes de que la cadena se una con otra cadena, este tipo de estructura es de tipo ramificada y si la cadena polimérica se une químicamente con otra cadena es de tipo entrecruzada. (Ebewele et al, 2000)



Figura 2. Tipos de estructura polimérica.

### 2.1.1 Polimerización

Dependiendo del tipo de reacción de polimerización puede ser clasificada en condensación, adición o polímeros por apertura de anillo. Los polímeros sintetizados por el método de condensación están formados por una serie de reacciones, en la cual dos

especies (monómero, dímero, trímeros, etc) pueden reaccionar en cualquier momento para formar una molécula más larga cuando dos grupos funcionales reaccionan químicamente entre sí, en el proceso una molécula pequeña, como agua o amonio es eliminada. La polimerización por adición es producida por reacciones en las cuales los monómeros son agregados uno tras otro en una cadena de crecimiento rápido o también llamada reacción en cadena en la cual conlleva tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La polimerización por apertura de anillo es cuando una estructura cíclica que, en presencia de un catalizador, sufre una apertura del anillo produce una cadena lineal. (Ebewele et al, 2000)

### **2.1.2 Copolímeros**

Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros dependiendo de su composición. Los polímeros que poseen una unidad repetitiva del mismo polímero son conocidos como homopolímero y las cadenas que contienen dos unidades repetitivas se llaman copolímeros. Esta cadena de copolímeros puede estar acomodada en diferentes órdenes a lo largo de la estructura. Los diferentes tipos de sistemas de copolímeros son: a) Copolímero aleatorio, la unidad repetida al azar en la cadena de la molécula. b) Copolímero alternado, de forma ordenada en un arreglo alternado de dos unidades repetitivas a lo largo de la cadena polimérica. c) Copolímero en bloque la cadena consiste en secuencias largas de cada unidad repetitiva químicamente unida. d) Copolímero en injerto, son secuencias de un monómero injertada en una parte de la cadena. (Ebewele et al, 2000).

### **2.1.3 Entrecruzamiento**

Es el resultado de la funcionalidad de la molécula, la cual se basa en la capacidad de Interligamiento, o del número de sitios disponibles para enlazarse con otras moléculas dándole una estructura tridimensional. El entrecruzamiento puede ser químico o físico. Las redes químicas tienen uniones permanentes, mientras que las redes físicas tienen uniones transitorias que surgen de enredos de cualquier cadena polimérica o de interacciones iónicas, puentes de hidrogeno o interacciones hidrofóbicas. (M. Ahmed, 2015). Agregar entrecruzamiento en las cadenas del polímero afecta directamente en las propiedades de este. Entre mayor sea el entrecruzamiento, la cadena polimérica será más rígida, en cambio, si se modera el entrecruzamiento podrá tener mayor elasticidad. El entrecruzamiento también afecta la solubilidad del polímero. Entre más cadenas estén unidas por enlaces covalentes, mayor será la insolubilidad. Los materiales poliméricos que son entrecruzados no se disuelven, pero si pueden absorber solventes. Las cadenas poliméricas entrecruzadas, al presentar un aumento en la temperatura, cambiara el empaque molecular local disminuyendo el volumen libre, lo que podemos interpretar como un colapso o encogimiento del material. (Maitra et al, 2014). Usar entrecruzantes es esencial para obtener un material poroso con fuerza y mantener los sitios unidos, en otras palabras, los polímeros con entrecruzantes estabilizan el microporo en la estructura tridimensional garantizando la conformidad de la forma y de los grupos funcionales de los sitios unidos a las moléculas de interés. (Bahrani et al, 2021)

### **2.2 Entrecruzantes**

Durante la polimerización los entrecruzantes acomodan los monómeros funcionales alrededor de las moléculas formando una red polimérica. Los entrecruzantes afectan la

morfología, las propiedades mecánicas de la matriz polimérica y la capacidad de selectividad y de unión. (WłochJanusz et al, 2019).

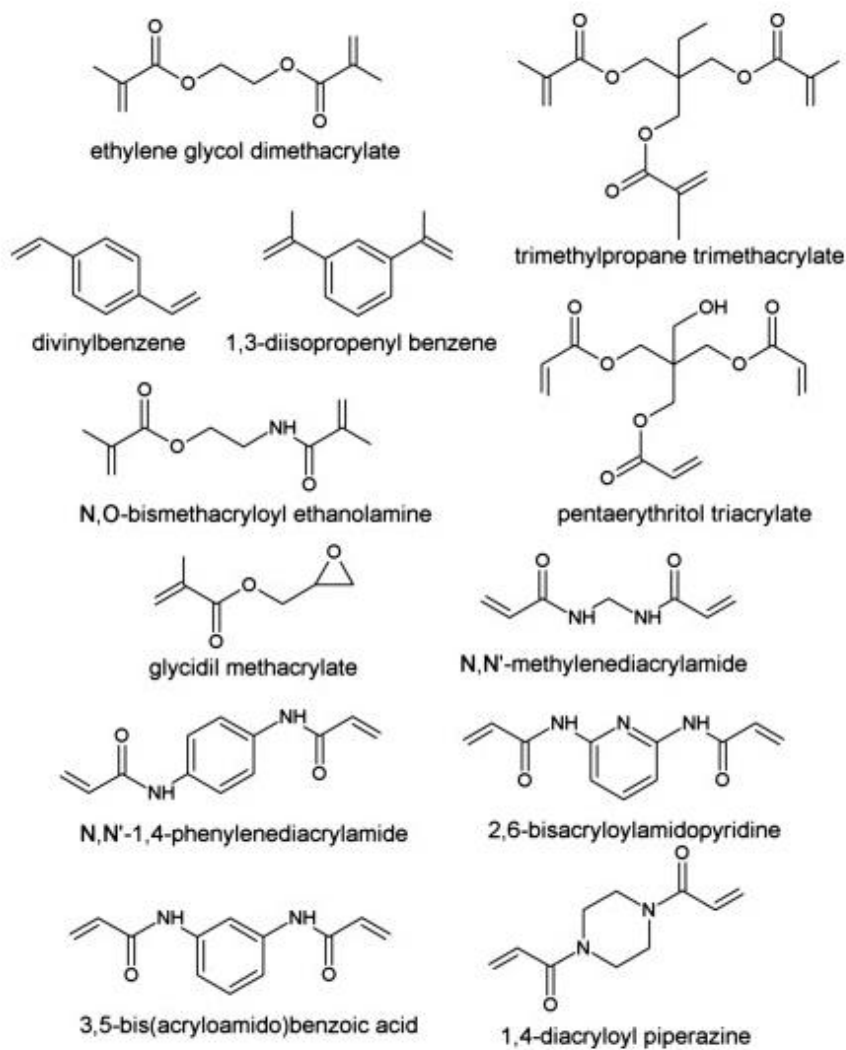


Figura 3. Moléculas de entrecruzantes.

## 2.3 Iniciadores

La iniciación es la primera etapa de la polimerización por adición la cual involucra un iniciador que active un sitio del monómero. Este proceso puede ocurrir espontáneamente por el cambio de temperatura, por luz ultravioleta, o por irradiación de alta energía. Pero la más frecuente, es la polimerización iniciada por radicales libres, en la cual se agrega una pequeña cantidad de componentes llamados iniciadores. Estos iniciadores generan la iniciación de la cadena y aceleran la velocidad de polimerización, no se consideran exactamente catalizadores porque cambian químicamente en el curso de la polimerización. Estos se descomponen térmicamente o por irradiación, produciendo radicales libres, los cuales contienen átomos con electrones no apareados. Cuando se escoge un iniciador de radicales libres se debe de considerar la temperatura que se va a usar en la polimerización y en la reactividad de los radicales para no desactivar al iniciador. La iniciación de la polimerización ocurre en dos pasos sucesivos. Primero sucede la formación de radicales y después la adición del radical iniciador a la cadena monomérica. La siguiente etapa se llama propagación y es cuando un monómero se une a otro monómero rápidamente. Esto involucra la adición de un radical libre al doble enlace del monómero, lo cual genera otro radical para el siguiente monómero y así sucesivamente. Dicho de otra forma, el centro activo es recolocada lo largo del crecimiento de la cadena polimérica. La terminación sucede cuando la propagación se desactiva por contener una tasa baja de iniciador o por reaccionar con otro radical libre. (Ebewele et al, 2000).

## 2.4 Ácido metacriloilamido hexanoico (PCAM5).

El ácido metacriloilamido hexanoico también es llamado PCAM5 o M5, dado que el número representa la cantidad de metilenos en la cadena de este polímero. El comportamiento de este monómero en otros estudios fue como polielectrolito hidrofóbico, por lo cual, se implementa su uso en sistemas responsivos a pH, además por sus propiedades térmicas el monómero PCAM5 es utilizado como copolímero para la síntesis de microgeles que nos permite desplazar la temperatura de transición del PNIPAAm hasta 40 °C en pH 7, dándonos la pauta para utilizarlo para fines biomédicos. (H. Magaña et al, 2017).

## 2.5 poli (N-isopropil acrilamida) NIPAAm

La poli (N-isopropil acrilamida) (NIPAAm) es uno de los polímeros termo responsivos llamados polímeros inteligentes. Tiene una temperatura baja critica de solución (LCST) de 32 °C, la cual resulta de los grupos amidas hidrofílicos y grupos isopropílicos presentes en las cadenas poliméricas. Al presentar una temperatura cercana a la temperatura fisiológica ha sido ampliamente estudiada para sistemas de liberación siendo el polímero termo responsivo más común. (Boztepe et al, 2020)

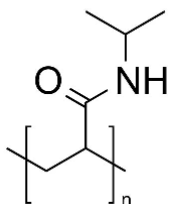


Figura 4. Molécula de poli (N-isopropil acrilamida) (NIPAAm).

## 2.6 N, N-Dimetilacrilamida (DMA)

Es un líquido claro, solvente no iónico, miscible en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos. PNIPAAm copolimerizado con monómeros hidrofílicos como el DMA genera que el hidrogel colapse cuando la temperatura llega por encima de LCST teniendo como resultado lo que llamamos liberación positiva, lo que significa que la red polimérica libera el agua absorbida o cuando sea el caso al fármaco cargado. (Afroz et al, 2018).

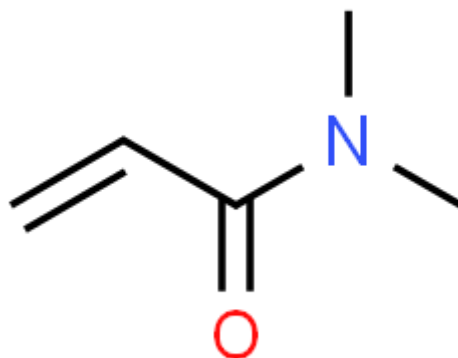


Figura 5. Estructura molecular de N, N-Dimetilacrilamida (DMA).

## 2.7 Microgeles

Los Microgeles son partículas submicrónicas de polímeros entrecruzados que también presentan capacidad de absorber agua y ser responsivos a estímulos externos. Son sintetizados a base de polimerización por precipitación en la cual, las condiciones de temperatura y crecimiento de la cadena polimérica por agregación de unidades monoméricas forman microgeles con diámetros alrededor de 600nm. Al estar presentes en la red polimérica tridimensional del hidrogel genera poros, resultando en una respuesta más rápida a la fase de hinchamiento-colapso, además de mejorar las

propiedades mecánicas y atrapar al fármaco cargado en estos poros para poder ser utilizado como sistema de liberación. (H. Magaña et al, 2017).

## **2.8 Hidrogeles como sistemas de liberación inteligente.**

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales de redes poliméricas entrecruzadas que pueden absorber agua e hincharse varias veces su volumen inicial seco. Este material hidrofílico presenta propiedades para absorción de metales pesados, sanar heridas, imitar tejidos y como sistema de liberación de fármacos. Los sistemas de liberación inteligente presentan fase de hinchamiento y contracción por estímulos como cambios en la temperatura, pH y composición del solvente que dependerá de los grupos funcionales en la estructura. (Afroz et al. 2018). Los hidrogeles de poli (N-isopropil acrilamida) son multi-responsivos, sensibles a estímulos, su temperatura LCST puede ser ajustada y el pH también. (Park et al. 2021). El estado hinchado del hidrogel se presenta por debajo de la LCST, cuando los puentes de hidrogeno entre el polímero y las moléculas del agua permiten al polímero hincharse. Cuando la temperatura aumenta por encima de los 32 °C, presentan una transición rápida de volumen en la que colapsan por deshidratación del hidrogel hinchado. Generalmente la concentración de los grupos hidrofílicos en la red polimérica puede cambiar la LCST respondiendo a diferentes rangos de temperatura. Los polímeros pueden contener grupos funcionales ionizables en la red polimérica y reaccionar a los cambios de pH, llamados polielectrolitos. Las propiedades de un hidrogel polielectrolito depende del pH del medio. Gracias a los grupos ionizables en las cadenas polielectrolíticas, los hidrogeles polielectrolitos hinchan más que los hidrogeles que no lo son. (Boztepe et al. 2020). El diseño de un sistema de liberación de fármacos está basado en la fisicoquímica de la forma y en las propiedades

farmacocinéticas. El factor que controla la liberación del fármaco es la capacidad del polímero a incrementar su volumen y cambiar de forma. El hidrogel en contacto con agua o con otro medio termodinámicamente compatible, permite la penetración del solvente en los espacios libres que están entre las cadenas macromoleculares lo que microscópicamente representa contacto de un solvente con un polímero causando un aumento del radio y distancia de terminación a terminación de la red polimérica. Otra característica sobre los hidrogeles responsivos sobre el mecanismo que causa los cambios en la red estructural es que son reversibles, es una deformación con comportamiento de 'forma memorizada', por lo que el hidrogel regresa a su forma original. (P. Gupta et al. 2002).

## CAPÍTULO III

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Síntesis del monómero ácido metacrililoilamido hexanoico (PCAM5).

Se comenzó con la síntesis del monómero. Se preparó de acuerdo con la reacción Schotten-Baumann. Primero se agregó 3.2g de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (AEAC) o ácido 6-aminohexanoico (131.1 g/mol) a un matraz bola de 250 mL y se disolvió con 100 mL de NaOH 1M y se le agregó 10 mL de THF.

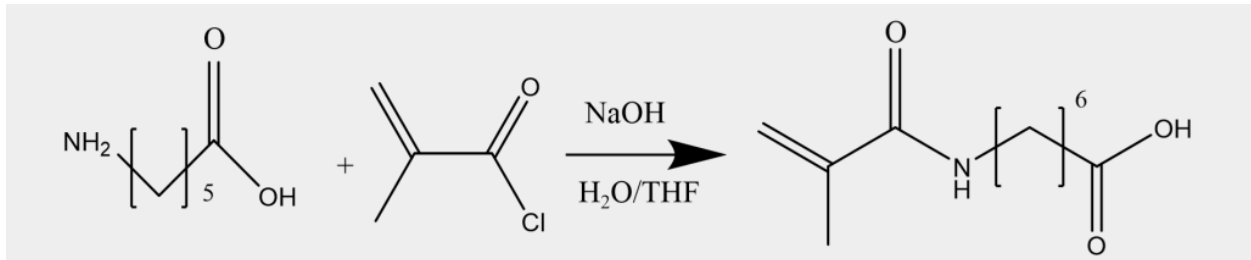


Figura 6. Reacción Schotten-Baumann para la síntesis de ácido metacrililoilamido hexanoico.

Se introdujo una barra magnética de agitación y se colocó en baño de hielo. Después se inició la agitación continua y se agregó el cloruro de metacrililoilo (CIM, 104.53 g/mol, 1.08g/ml a 20°C) gota a gota con una bomba de adición. Se dejó la mezcla de reacción alcanzar la temperatura ambiente durante 20 horas. Terminada la reacción, se colocó el contenido del matraz bola en un vaso de precipitado a 0°C y con agitación constante para medir su pH y en caso de ser necesario acidificar con HCl 2M a pH 3. Esta solución se le realizó una extracción con un embudo de separación con 50 mL de éter etílico. En cada extracción, se coloca la fase acuosa en un vaso de precipitado y la fase orgánica en otro vaso de precipitado. A la fase acuosa se le realizaron de dos a tres lavados.

Posteriormente se le realizo otro lavado de éter a la solución acuosa con solución de HCl y un último lavado con agua destilada. Cuando se agrega la fase acuosa y el éter se tiene que hacer un mezclado enérgico de forma circular, con una mano en la boquilla y otra en la llave, cada que se agita de esta forma se debe abrir la llave para expulsar gas. Se recomienda hacerlo tres veces. La agitación se realiza en cada lavado. A la fase orgánica resultante de la extracción se le agrego  $MgSO_4$  anhidro para eliminar el agua en la solución orgánica y después se filtró al vacío con papel filtro no. 1 (110mm) en un matraz Kitasato y se vertió en un recristalizador tapado. Después se dejó en la campana hasta que se evaporara el solvente y solo quedara el monómero de apariencia café claro. Después se colocó en la estufa a 36 a 40 °C al vacío por 5 días. (Cornejo et al. 2020).

### **3.2 Cromatografía en capa fina.**

Se utilizo como muestra una gota del monómero en 0.5mL de metanol, como referencia se utilizó 50mg de ácido 6 aminocaproico en 0.4 mL de metanol y como fase móvil se utilizó una mezcla 1:9 de metanol y diclorometano. No se logró disolver, se intentó con THF y no se logró obtener resultado.

### **3.3 Caracterización con resonancia magnética nuclear.**

Se agrego en un tubo para muestra de RMN el monómero sintetizado PCAM5 y cloroformo deuterado. Se utilizo otro tubo que solo contenía cloroformo deuterado como muestra blanco y se introdujeron en el equipo spinsolve high 60MHz.

### **3.4 Caracterización por espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).**

Se caracterizo la molécula por espectro infrarrojo, la cual detecta los movimientos vibracionales de los grupos funcionales presentes en longitud de onda de 4000 a 650

cm<sup>-1</sup> mediante la incidencia de un haz de luz infrarroja sobre la muestra, tomando en cuenta la relación señal/ruido empleando el modelo Nicolet IS5 Thermo Scientific.

### **3.5 Síntesis de microgeles de PNIPAAm con PCAM5.**

La síntesis de los microgeles se realizó mediante polimerización por dispersión. Primero se purifico el dimetilacrilato de etilenglicol (EDGMA) de la siguiente manera: Se envolvió el vial y la pipeta de vidrio en papel aluminio, después se llenó la pipeta Pasteur de vidrio con inhibidor de hidroquinona y se colocó en el soporte universal. Se puso el vial debajo de la pipeta y se le agregó el EDGMA dentro de la pipeta para que pasara por todo el inhibidor de hidroquinona. Para obtener los microgeles, se pesó 0.4253g de NIPAAm y 50mL de agua con 0.0765g de PCAM5, esto se agregó a un matraz bola de 250mL 41 µL de EDGMA purificado. Se colocó en atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. Se desconectó del sistema de nitrógeno para introducir el matraz 30 minutos en el baño de aceite previamente calentado a 80-85°C. alcanzada la temperatura se insertó 0.4mL de APS reaccionando durante 45 minutos. Al terminar se dejó a temperatura ambiente para ser traspasado a un matraz Erlenmeyer en baño de hielo durante 10 minutos.

Seguidamente se realizó la caracterización de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS) seguido de un análisis de temperatura. colocando la solución de microgeles en una membrana de diálisis durante 5 días cambiando el agua desionizada diariamente. Posteriormente se congelaron y se liofilizaron durante 3 días.

### **3.6 Caracterización por dispersión de luz dinámica (DLS).**

Se tomó una muestra de 1000µL de los microgeles en solución y se colocaron en una celda para su lectura. Se eligió el programa para tamaño y se obtuvo la lectura de tamaño

a 25 °C. Para el Trent de temperatura se realizó para pH 5 y pH 7.4 por separado tomando varias lecturas en un rango de 20 °C a 50 °C para cada muestra.

### **3.7 Síntesis de hidrogel microestructurado.**

Se comenzo agregando el NIPAAm con DMA (dimetilacrilamida). A esta mezcla se le adiciono el entrecruzante EGDMA y las microparticulas en una proporción del 15% con respecto a los monómeros, se mezcló por 15 minutos, se colocó en baño maría y se agrega el iniciador persulfato de amonio (APS) y el catalizador tetrametiletilendiamina (TEMED). Inmediatamente se colocó entre dos vidrios salinizados de 10 x 10 cm durante 48 horas a 4 °C. El salinizado es un proceso en el que la superficie se condiciona para que sea adherible. Una vez que gelifico el hidrogel microestructurado se sacó de los vidrios salinizados y se cortaron discos del hidrogel de un 1cm de diámetro. Se dejo secando por 3 días. Nuevamente se sintetizo un segundo hidrogel microestructurado en el cual la proporción de los MGs fue de 30% y los demás reactivos se ajustaron con respecto a esta modificación. Se procederá a la caracterización de estos hidrogeles respecto a temperatura y pH.

### **3.8 Grado de hinchamiento con hidrogeles de PNIPAAm/ DMA como pruebas blanco.**

Se prepararon dos tipos de hidrogeles para comenzar con las pruebas de grado de hinchamiento. Primero se preparó un hidrogel de PNIPAAm y otro de PNIPAAm/DMA en proporción 80/20. Se realizaron las pruebas de grado de hinchamiento en buffer de pH 5 y 7.4, se realizó un tercero con agua. Cada cinética de hinchamiento se analizó en tres diferentes temperaturas, 33°C 37°C y 42°C. Y se pesaron los hidrogeles cada 15 minutos

hasta cumplir una hora, después se midió cada hora hasta cumplir tres horas y la última medición se tomó a las 24 horas.

### **3.9 Cinética de hinchamiento.**

El grado de hinchamiento se analizó colocando discos de hidrogel de 1cm de diámetro en pH de 5 y 7.4 y de 33 °C, 37 °C y 42 °C. Se realizó la prueba a cada temperatura por triplicado. Se colocó un disco de hidrogel de PNIPAAm/DMA con MGs al 15% seco previamente pesado en cada vial con 4ml de buffer o agua correspondiente y de igual forma se hizo para 9 hidrogeles de PNIPAAm los cuales servían como nuestro control. Se colocaron los viales en el oscilador a 33 °C, fue la primera temperatura que se evaluó el grado de hinchamiento; Se pesó el hidrogel a los 15, 30, 45, 60, 120, 180 minutos y a las 24 horas y se reportó; Lo mismo se realizó con temperatura de 37 °C y 42 °C.

### **3.10 Cinética de Colapso.**

Se utilizaron los discos de hidrogel microestructurados al 30% por que los discos de 15% no presentaron buena respuesta a la temperatura. Primero se pesaron dos discos de hidrogel en seco, después se dejaron hinchando los discos de hidrogel microestructurado durante 24 horas en buffer PBS de pH 7.4 a 25 °C. Al día siguiente se encendió el recirculador a una temperatura de 42 °C. Mientras tanto, se pesaron los hidrogeles microestructurados ya hinchados registrando esa medida como peso en tiempo cero y una vez que llegó a la temperatura se introdujeron los discos de hidrogel y se comenzaron a pesar a los 2 minutos, después a los 5, 10, 15, 20 y 30 minutos por último.

### **3.11 Ciclos de hinchamiento-colapso.**

Se realizaron dos ciclos de hinchamiento-colapso con los discos de hidrogeles microestructurados. Primero se dejaron hinchar durante 24 horas en buffer PBS de pH 7.4 a 25 °C. 24 horas después en recirculador a 42 °C, se colocaron los hidrogeles previamente pesados y se registró el peso del hidrogel microestructurado a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Se repite para completar un ciclo pasando de la temperatura de 42 °C a 25 °C y nuevamente se pesa a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Se completaron dos ciclos, por lo tanto, se repitió dos veces el pesado en cada temperatura.

### **3.12 Microscopias de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM).**

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo es un instrumento que barre un haz de electrones sobre la superficie de la muestra mientras que en un monitor se visualiza la información que nos interesa en función de los detectores disponibles. El FESEM utiliza un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, (0.02 -5 kV); esto ayuda a minimizar el efecto de carga en especímenes no conductores y a evitar danos en muestras sensibles al haz electrónico.

Se prepararon las muestras colocando en un tubo de micro centrifugación eppendorf 4mg de microgeles liofilizados en 100µL de agua desionizada. Después de que se dispersaron estos MGs se colocó sobre una malla de cobre recubierta con carbono agregando 2µL de esta solución y con un gotero se agrega una gota de acetato de uranilo

al 2%. Se guardó dentro de un microtubo Eppendorf y se dejó secar un par días. La muestra de hidrogel se preparó tomando un pedazo de hidrogel microestructurado que se introdujo en un vial con 2ml de agua desionizada y se liofilizo. Las muestras fueron enviadas al laboratorio del Centro de Graduados ITT. Para su observación, con ayuda de unas finas pinzas, las muestras fueron colocadas en una base llamada 'pin stub' los cuales son unos discos metálicos conductores de la electricidad en los cuales tienen un adhesivo de superficie un tanto pegajosa de doble cara con carbono para que también sea conductor. Por último, la muestra se introdujo en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JSM-7800F prime a 25 Kv y se realizó las observaciones en el software.

### **3.13 Etiquetado de albúmina con fluoresceína.**

Se preparó albúmina a 0.25mM, FITC 5mM, NH<sub>4</sub>Cl 200mM, NaHCO<sub>3</sub> 0.1M, NaHCO<sub>3</sub> 0.5M para etiquetar albumina con fluoresceína. Primero se preparó el tubo con albumina pesando 66mg en un tubo cónico agregando 1ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M y con una micropipeta se extrajo 500µl y se descartaron. Posteriormente se agregó 1500 µl de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M. En otro tubo cónico se agregó 3.8938mg de FITC y 2ml de DMSO. Se descarto 1ml de FITC ya preparado y se agregó 2ml de albúmina preparada. Se mezclo y se agregaron 7ml de agua destilada, por último, se protegió de la luz cubriendo el tubo cónico con papel aluminio y se guardó en refrigeración 24 horas. Después de 24 horas se detuvo la reacción con 5ml de NH<sub>4</sub>Cl y se dejó 2 horas a 4 °C.

Se realizó la separación por medio de una columna PD10, la cual está compuesta por una resina llamada Sephadex G-25 que permite un cambio rápido de buffer y eliminación de sales, tinturas y etiquetas, por lo tanto, se utilizó para separar la albumina etiquetada

con FICT de la no etiquetada. Se monto la columna en un soporte universal y se vació por completo dejando solamente la columna de resina. Se hicieron cuatro lavados de columna llenando nuevamente la columna con buffer PBS de pH 7.5. después del lavado, una vez vacía la columna, se agregó 2.4ml de muestra, enseguida se agregaron 3.4ml de buffer PBS 7.4 pH se dejó recorrer por la columna la muestra y el buffer monitoreando la separación, se descartaron las primeras gotas y se recolecto después de las primeras gotas. En la fase más alta se queda la albumina no etiquetada y es más lenta en atravesar toda la columna, después de recolectar suficiente albumina etiquetada se colocó un vaso de precipitado para recolectar el resto no etiquetado para su posterior desecho. La albumina etiquetada recolectada se guardó con protección de la luz y en refrigeración.

### **3.14 Cargado del hidrogel microestructurado con albumina-FITC.**

Antes del cargado de los hidrogeles microestructurados es necesario cambiar el pH de la solución de albumina-FITC de pH 7.4 a pH 5 en diálisis durante 2 días cambiando continuamente el buffer pH 5. Se utilizo el tubo cónico de albumina-FITC que contenía 109.42mg/ml, 0.755 Abs (tubo 3). Después de cumplir los dos días en diálisis se midió el pH para confirmar que se logró cambiar. El cargado se llevó a cabo con los hidrogeles microestructurados al 30% debido a su mayor capacidad para colapsarse-hincharse. Se pesaron tres discos de hidrogel microestructurado en seco y se colocaron en la solución de albumina-FITC de pH 5 que contenía una concentración de 109.42mg/ml, durante 72 horas en el oscilador a una temperatura de 33 °C. Una vez pasadas las 72 horas se extrajo cada disco y se dejó secar 24 horas.

### **3.15 Liberaciones de albumina-FITC.**

Después de que el disco de hidrogel microestructurado estuvo completamente seco se introdujo en buffer pH 7.4 durante 2 minutos para un enjuagado de la superficie. En seguida se introdujeron en viales con 3 ml de buffer pH 7.4 para realizar a la liberación. Primero se realizó una liberación a 37 °C tomando alícuotas de 1ml para leer en espectrofotómetro cada 15, 30, 45 y 60 minutos. Se realizó una segunda liberación a 42 °C nuevamente tomando alícuotas cada 15, 30, 45 y 60 minutos para su lectura. Cada alícuota tomada se descartó y se agregó un ml de medio nuevo para evitar la saturación del medio.

## CAPÍTULO IV

# RESULTADOS

## 4.1 Síntesis de monómero ácido metacrililoilamido hexanoico.

Llevando a cabo la reacción Schotten-Baumann con la cual se obtuvo el monómero PCAM5. El producto obtenido fue de 1.3408 gramos presentando consistencia viscosa de color miel con un rendimiento de 19.53%.

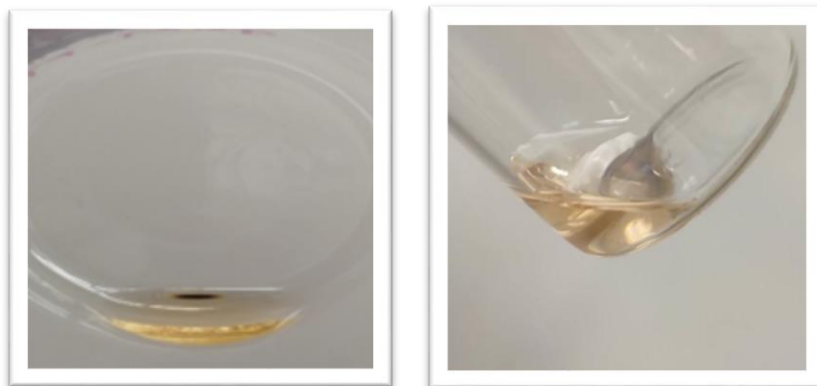


Figura 7. Resultado de la síntesis del ácido metacrililoilamido hexanoico.

## 4.2 Caracterización con resonancia magnética nuclear.

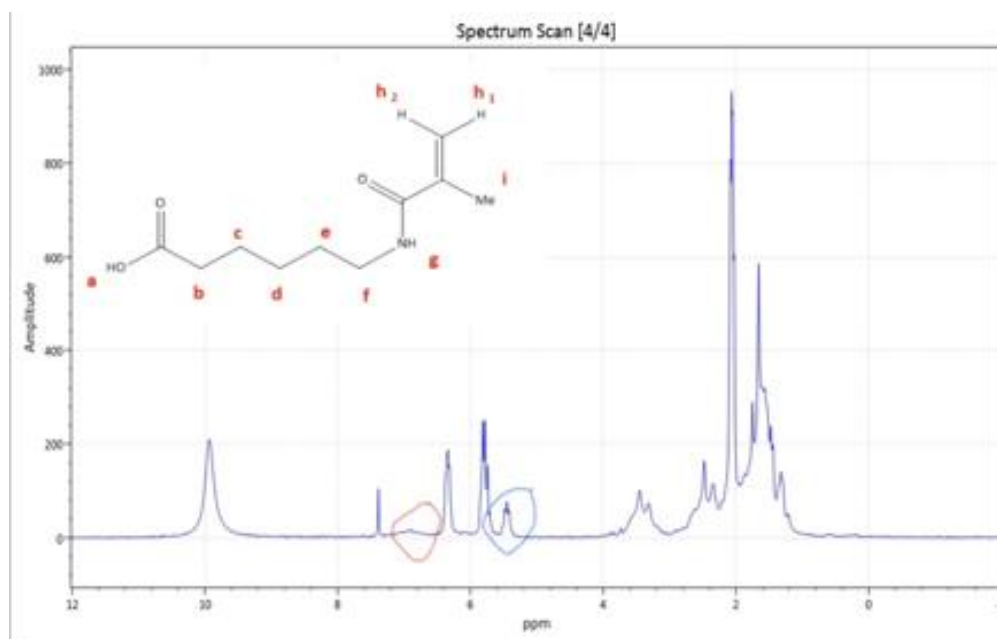


Figura 8. RMN del ácido metacrililoilamido hexanoico (CAM5).

En la resonancia magnética nuclear el espectro del monómero es identificando de izquierda a derecha la señal etiquetada como “a” en un rango de 10 de desplazamiento químico en ppm como el hidrógeno que esta enlazado al oxígeno del grupo ácido carboxílico, ya que este oxígeno está tomando densidad electrónica de este hidrogeno posiblemente por resonancia. La señal “g” es del hidrogeno enlazado con el nitrógeno que al estar directamente enlazado con este lo encontramos en un rango de 6 a 7 ppm. Las señales de “h<sub>1</sub> y del h<sub>2</sub>” por estar enlazados a un carbono que tiene doble enlace las encontramos en un rango de 5 a 6; El doble enlace al tener una hibridación sp<sup>2</sup> los electrones están más cercanos al núcleo, por lo tanto, se presenta electronegatividad y desplazan esta señal. La señal “f” pertenece a los hidrógenos enlazados con el carbono vecino del nitrógeno, es por esto por lo que es la señal más desplazada del resto de los hidrógenos unidos a los carbonos de la cadena alifática. La señal “b” se encuentra en el rango de 2 a 3 y pertenece al hidrógeno unido al carbono vecino del carboxilo. Las señales “e, c y d” son del resto de la cadena alifática y la señal “i” pertenece a los protones del grupo metilo.

#### **4.3 Síntesis de microgeles de PNIPAAm con ácido metacrililamido hexanoico.**

Se obtuvieron microgeles de PNIPAAm co-polimerizados con ácido metacrililamido hexanoico en proporciones de 85% y 15% respectivamente, utilizando 5% de dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) como entrecruzante y 2% de persulfato de amonio (APS) como iniciador. Los microgeles presentaron en apariencia macroscópica un líquido color blanco. (Figura 9)



Figura 9. Microgeles de PNIPAAm con ácido metacrililamido hexanoico.

#### 4.4 Caracterización por dispersión de luz dinámica (DLS).

A los microgeles obtenidos se midió su tamaño por medio de dispersión de luz dinámica obteniendo un diámetro hidrodinámico de 608.9 d.nm a 25°C para después ser liofilizados. Después de la liofilización se re-suspendieron en agua destilada para medir su tendencia ("trend") de temperatura en dos pH diferentes, 5 y 7.4 esperando ver un comportamiento de encogimientos cercano a los 33 °C para pH 5 y de 37 °C para pH 7.4.

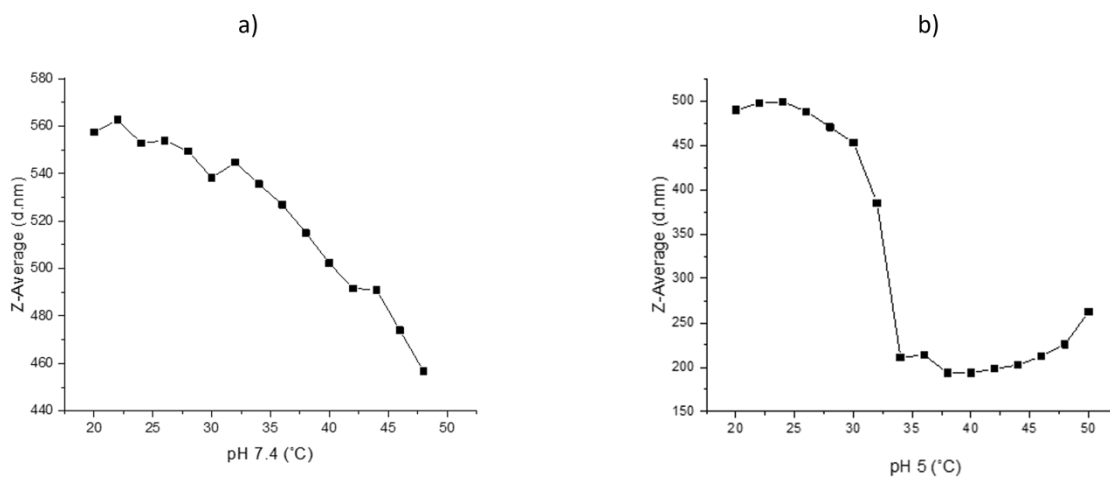


Figura 10. “Trend” de tamaño contra temperatura de los microgeles NIPAAm-PCAM5 en pH 7.5 (a) y pH 5 (b). Mediante dispersión de luz dinámica (DLS) se midió el diámetro de las micropartículas en un rango de temperatura desde los 20 °C hasta los 50 °C.

La temperatura de transición de Microgeles constituidos de solo PNIPAAm es de 32 °C, lo que observamos con la copolimerización es como se desplazó la temperatura. En este caso se mostró en las gráficas una variación de tamaño en pH 7.4 en la Ttr de 38°C. y en pH 5 una Ttr de 34 °C. (Figura 10) Resultaron de la toma de tamaños en las siguientes temperaturas:

Tabla 1. Tamaño de Microgeles frente a 20 °C hasta los 50 °C.

Microgeles PNIPAAm/PCAM5 en pH 7.4		Microgeles PNIPAAm/PCAM5 en pH 5	
°C	d.nm	°C	d.nm
20	557.4	19.9	489.5
22.1	562.6	21.9	497.4
23.9	552.8	24	498.9
26	553.9	26	487.8
28	549.4	28	470.3
30	538.2	30	453
32	544.7	32	385
34	535.6	<b>34</b>	<b>219.8</b>
36	526.9	36	214.1
<b>38</b>	<b>515</b>	38	193.6
40	502.2	40	193.6

42	491.6	42	198.3
44	491	44	202.6
46	474	46	212.6
48	456.7	48	225.9
50	432.5	50	262.3

Se calculo la derivada de los datos y se tomó el punto más alto, coincidiendo con las temperaturas antes señaladas.

#### **4.5 Caracterización por espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).**

Se caracterizaron tres muestras en el espectro infrarrojo, la primera de PNIPAAm, la segunda del ácido metacrililamido hexanoico y la tercera de los microgeles que contenían PNIPAAm/ácido metacrililamido hexanoico. Se puede ver que los picos de los tres espectros son muy parecidos, estos contienen las señales de los enlaces N-H, C-O, C-H, C=O que los caracterizan a estas tres moléculas a diferencia de la molécula de PNIPAAm que omite el enlace O-H por que esta no lo contiene. También se puede apreciar como se crea un sobretono del enlace N-H con los O-H cerca de los  $3000\text{ cm}^{-1}$  en la molécula b y c. El pico del enlace C=O cabe mencionar que se identifica por ser un carbonilo de amida por estar en un número de onda menor a  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Figura 11).

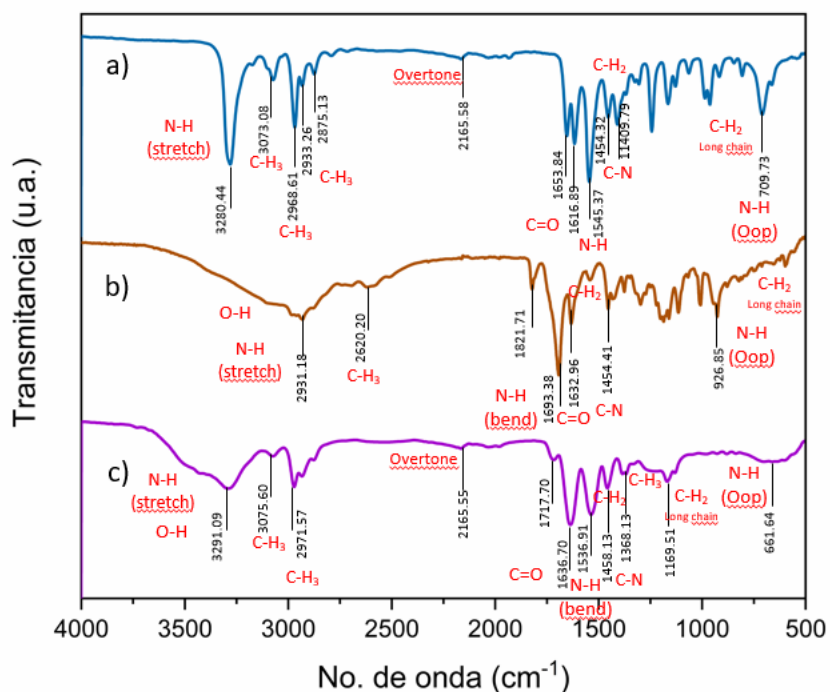


Figura 11. Espectro infrarrojo de los (C) microgeles de PNIPAAm/M5 comparando el espectro de (A) PNIPAAm solo y el monómero del (B) ácido metacrililoilamido hexanoico.

#### 4.6 Microscopias de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM).

Los microgeles fueron observados en microscopia electrónica de barrido (SEM/FESEM) la cual nos mostró los microgeles resultantes de la síntesis. Se puede observar esféricos y uniformes. En un campo de 100nm se mide cada microgel y se obtiene un promedio de 179nm utilizando el programa ImageJ.js (Figura 12). Con un mayor acercamiento se pueden ver los extremos de las cadenas que conforman estos microgeles. (Figura 13).

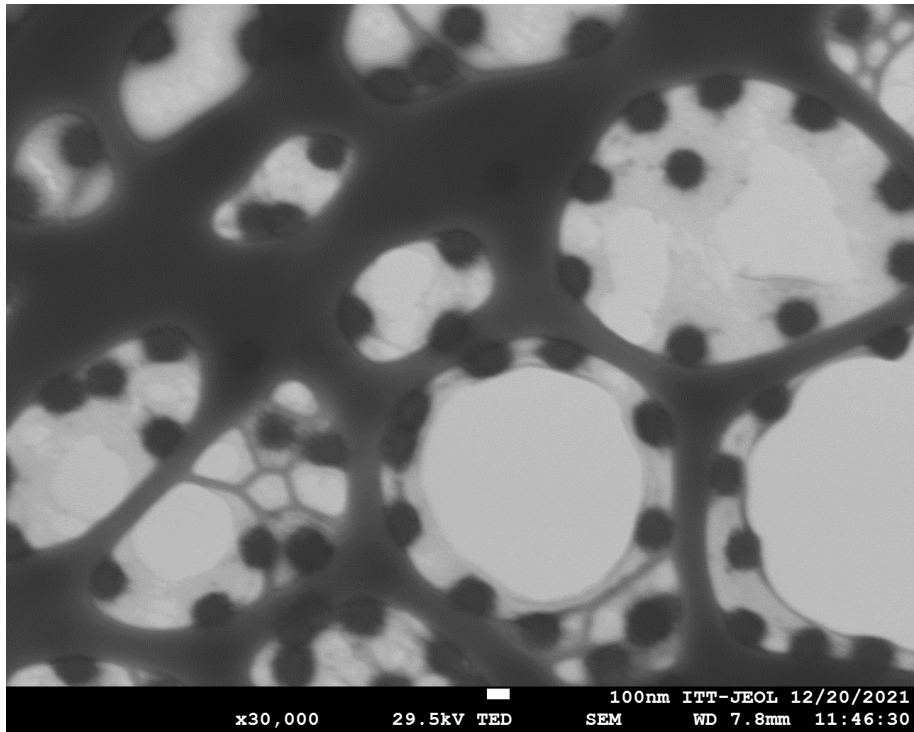


Figura 12. Micrografía FESEM de los microgeles de PNIPAAm/CAM5. x30,000

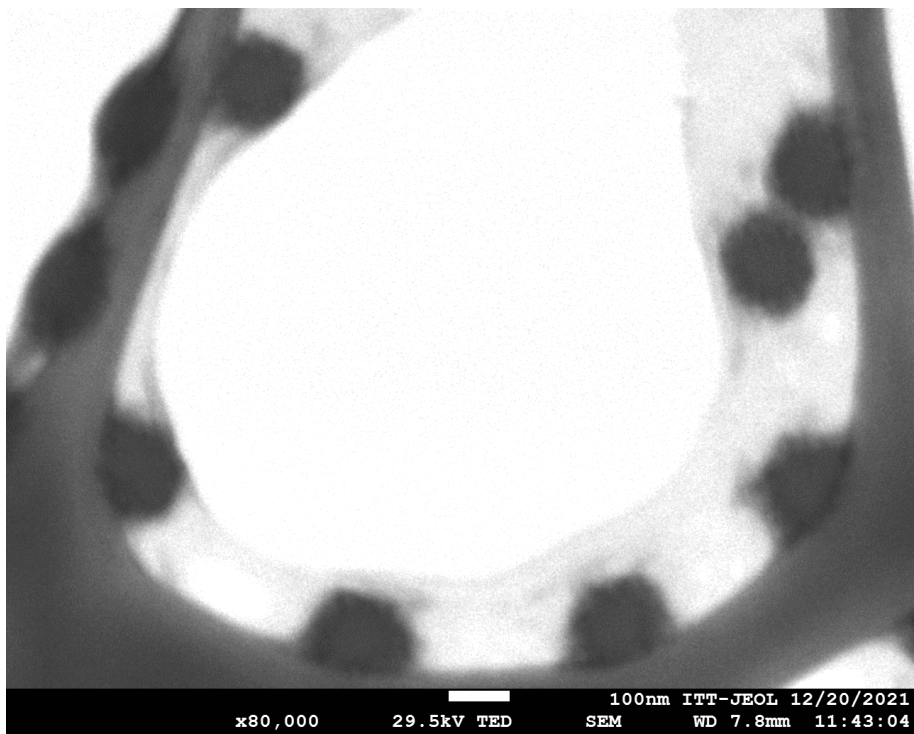


Figura 13. Micrografía FESEM de los microgeles de PNIPAAm/CAM5. x80,000

#### 4.7 Síntesis de hidrogeles de PNIPAAm/ DMA como pruebas blanco.

Se realizaron estudios de cinética de hinchamiento con hidrogeles de PNIPAAm y con hidrogeles de PNIPAAm/DMA (80:20). Los resultados obtenidos a 33 °C, 37 °C y 42 °C con pH 5, pH 7.4 y con agua se graficaron de la siguiente manera:

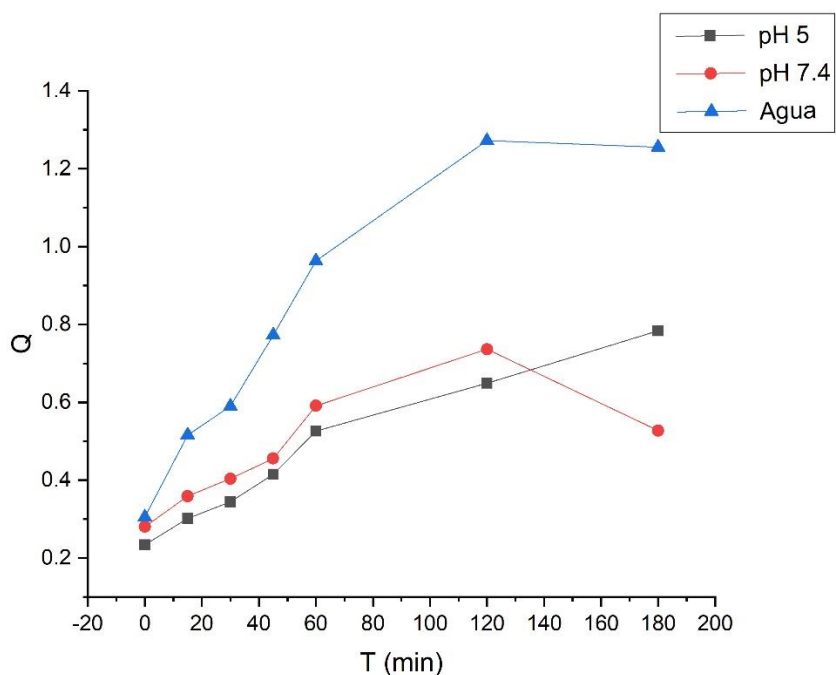


Figura 14. Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm a 33°C.

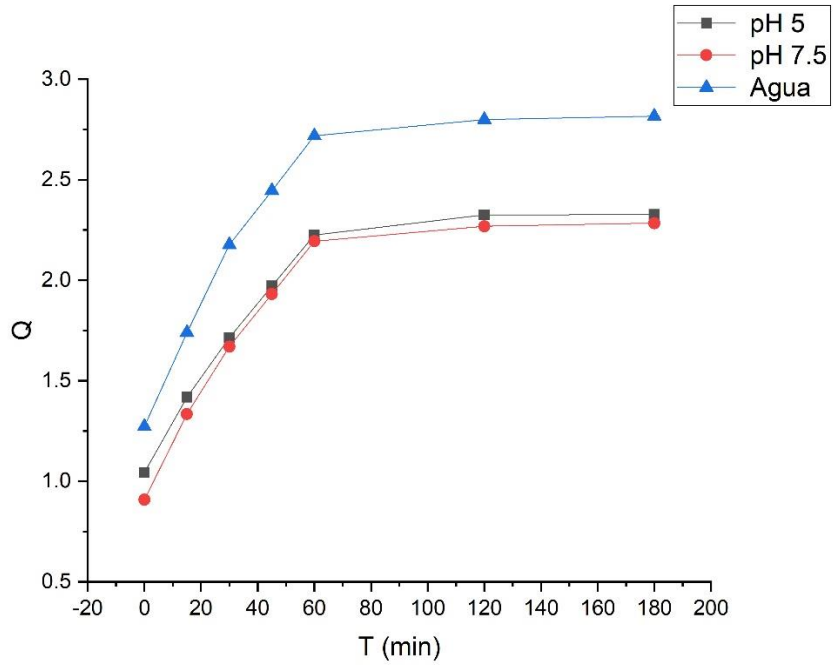


Figura 15. Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm/DMA 33°C.

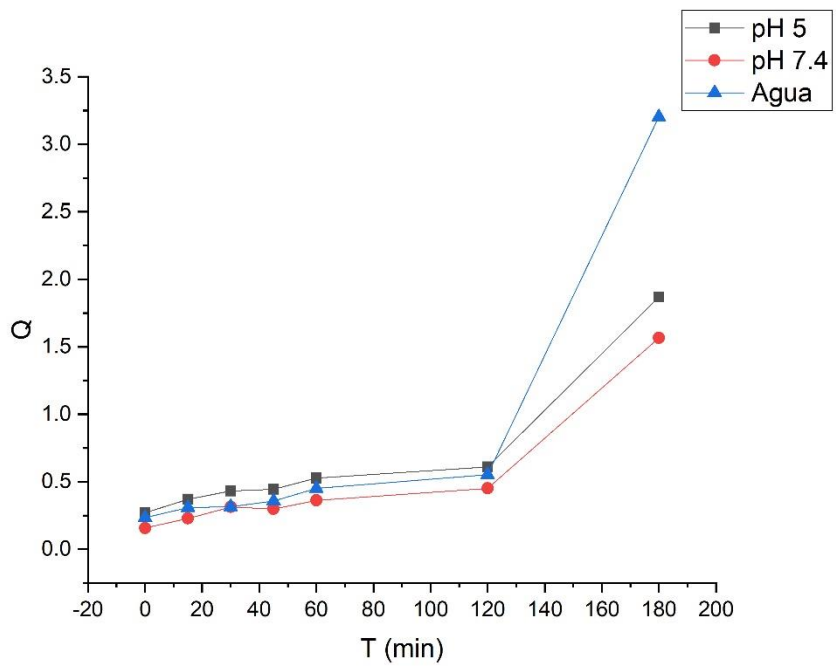


Figura 16. Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm a 37°C.

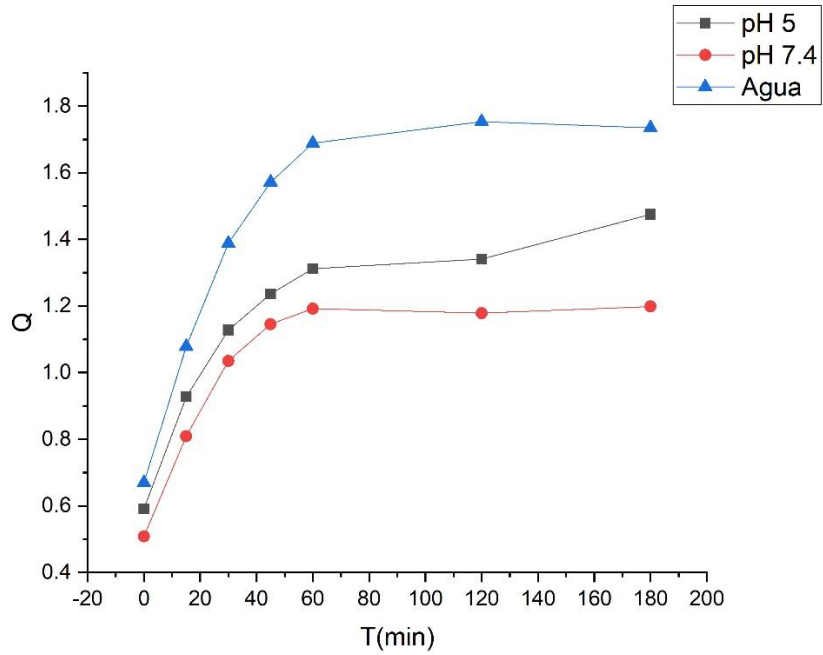


Figura 17. Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm/DMA a 37°C.

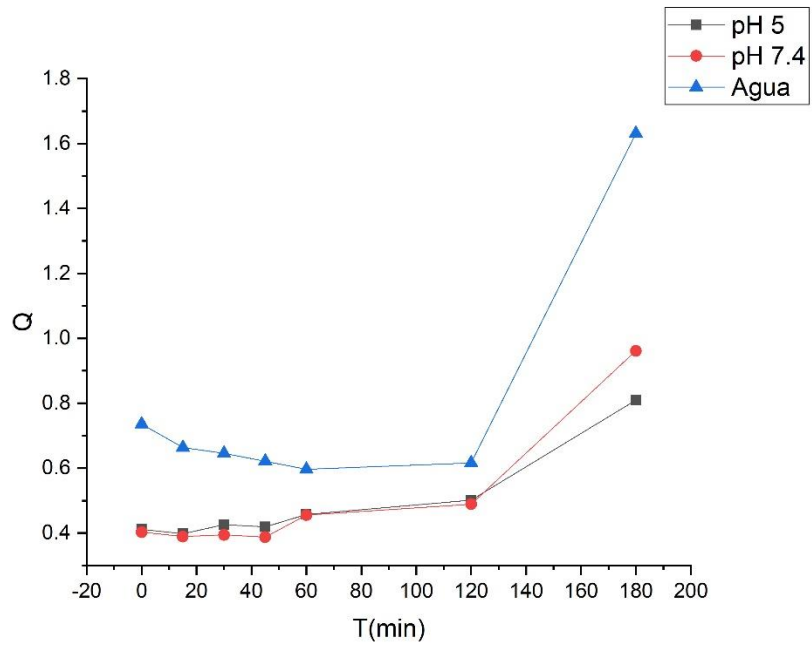


Figura 18. Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm a 42°C.

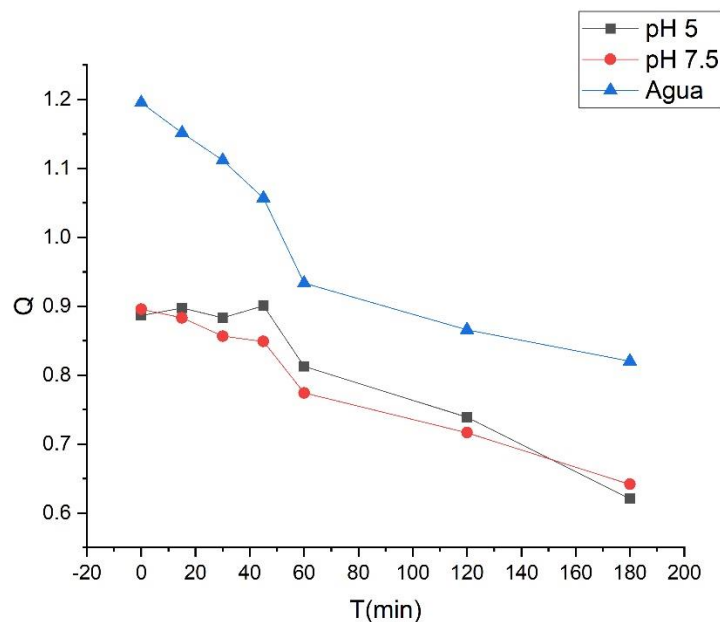


Figura 19. Cinética de grado de hinchamiento del hidrogel PNIPAAm/DMA a 42°C.

Es observable que los dos hidrogeles a 33 °C en agua como medio tienen un comportamiento similar pero el grado de hinchamiento es mayor en el hidrogel de PNIPAAm/DMA. Para pH 5 y pH 7.4 el hidrogel de PNIPAAm/DMA presenta una cinética de hinchamiento cercano a 2.

El hidrogel constituido por PNIPAAm a 37 °C en agua se mantiene constante hasta después de las dos horas hasta llegar a un grado de hinchamiento de 3 y para pH 7.4 y pH 5 llegó al grado de hinchamiento fue cercano a 1.5, en cambio, el hidrogel de PNIPAAm/DMA a 37 °C si incrementa su grado de hinchamiento en menor tiempo.

A 42 °C el hidrogel de PNIPAAm/DMA desciende su grado de hinchamiento conforme al tiempo. Es observable que esto también sucede en pH 7.4, el cual es el que se utilizará para las liberaciones, lo que nos da la posibilidad de liberar la albumina que será cargada.

#### 4.8 Síntesis de hidrogel microestructurado.

Después de analizar el grado de hinchamiento de los hidrogeles compuestos por PNIPAAm/DMA (80:20) y de solamente PNIPAAm se procedió a preparar el hidrogel microestructurado de NIPAAm/DMA más microgeles de NIPAAm/CAM5. Se obtuvieron hidrogeles microestructurados al 15% y al 30% de apariencia transparente pero opaco, de consistencia blanda a la humedad y rígido cuando está seco.



Figura 20. Hidrogel microestructurado cortado en forma de disco con 1cm de diámetro.

#### 4.9 Cinéticas de hinchamiento.

A medida que se difunde el agua dentro del hidrogel, la respuesta de las cadenas no es inmediata. El hinchamiento implica el movimiento de grandes segmentos de las cadenas del polímero para permitir la incorporación del agua, lo que nos genera una separación macromolecular. La difusión de pequeñas moléculas depende de las propiedades físicas de la red de polímero y de las interacciones entre los segmentos del polímero. (J. Benítez et al, 2015). Esta propiedad física es de gran importancia para el cargado de los hidrogeles y se calcula con la capacidad de retención de agua (WRR, por sus siglas en inglés (water retention ratio)), la cual se evaluó de acuerdo con la ecuación dando como resultado 1:

$$WRR = \frac{W_t - W_d}{W_d * Q} \times 100\%$$

En la cual  $W_t$  representa el peso del hinchamiento con el tiempo,  $W_d$  el peso del hidrogel en seco y  $Q$  el grado de hinchamiento, que como recordamos se calcula:

$$Q = \frac{W_t - W_d}{W_d}$$

#### 4.9 Cinética de colapso.

Los hidrogeles microestructurados al 15% no respondieron tan rápido al colapso en buffer de pH 5 ni de pH 7.4 a 42 °C, en cambio los hidrogeles microestructurados al 30% en pH 5 colapsaron la mitad de su tamaño en los primeros minutos. Se calculo el grado de hinchamiento con la formula:

$$Q = \frac{(W_s - W_d)}{W_d}$$

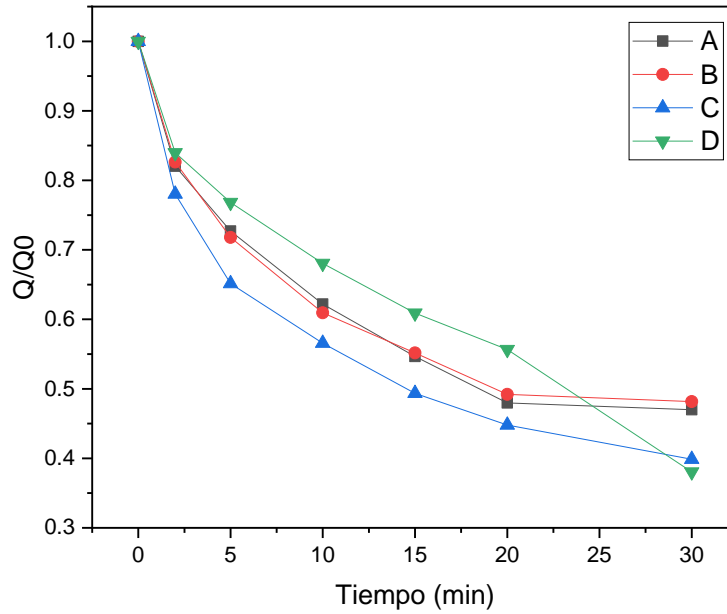


Figura 21. Grado de hinchamiento de los hidrogeles microestructurados al 15% a 42 °C. Donde los hidrogeles son (A) Hidrogel microestructurado a pH 5, (B) Hidrogel no microestructurado a pH 5, (C) Hidrogel microestructurado a pH 7.4, (D) Hidrogel no microestructurado a pH 7.4.

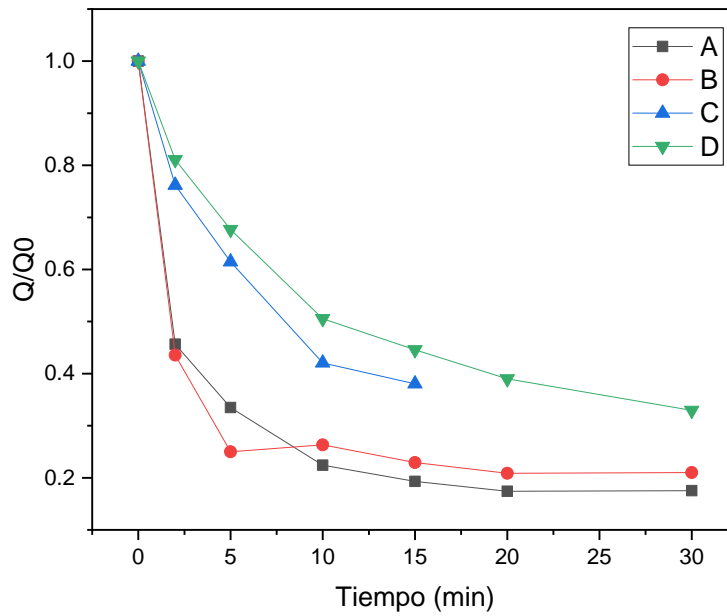


Figura 22. Grado de hinchamiento de los hidrogeles microestructurados al 30% a 42 °C. Donde los hidrogeles son (A) Hidrogel microestructurado a pH 5, (B) Hidrogel no microestructurado a pH 5 (C) Hidrogel microestructurado a pH 7.4 (D) Hidrogel no microestructurado a pH 7.4

#### 4.11 Ciclos de hinchamiento-colapso

Al compararse las cinéticas de colapso entre los dos porcentajes sintetizados se decidió utilizar el hidrogel microestructurado al 30% lo cual nos dio como resultado los siguientes datos.

Tabla 2. Peso en gramos de los hidrogeles en dos ciclos de cinéticas de hinchamiento-colapso a pH 7.4 en temperaturas de 42 °C a 25 °C.

Temperatura	Tiempo (min)	Hidrogel <sub>A</sub>	Hidrogel <sub>B</sub>
25 °C	0	0.0812	0.0808
42 °C	15	0.0407	0.0402
	30	0.0376	0.0366
	45	0.0368	0.0368
	60	0.0363	0.0376
25 °C	15	0.0535	0.0568
	30	0.0689	0.0679
	45	0.0799	0.0778
	60	0.0883	0.0868
42 °C	15	0.0368	0.0353
	30	0.0345	0.0331
	45	0.0341	0.0326
	60	0.0337	0.0322
25 °C	15	0.0581	0.0561
	30	0.0690	0.0698
	45	0.0774	0.0769
	60	0.0788	0.0805

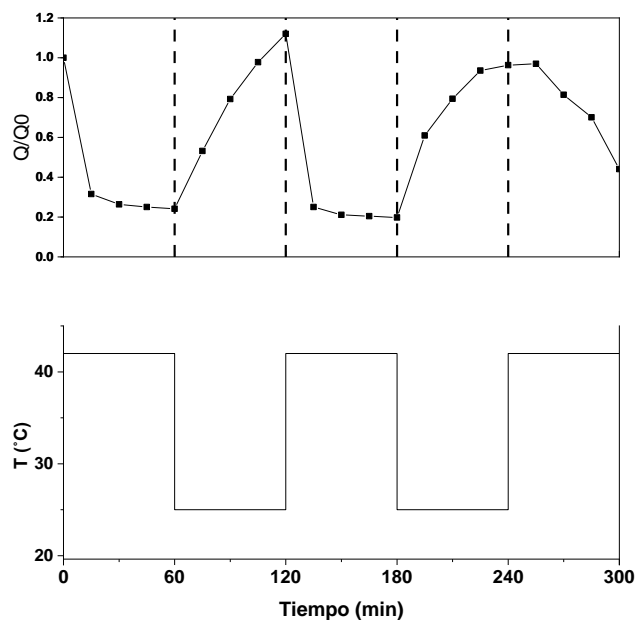


Figura 23. Ciclos de hinchamiento-colapso a pH 7.5 en temperaturas de 42 °C a 25 °C. Durante la primera hora el hidrogel disminuyo su tamaño a una temperatura de 42 °C seguido de un cambio de temperatura a 25 °C lo cual influencio para que el hidrogel aumentara nuevamente su tamaño interpretando este ciclo de hinchamiento colapso como respuesta ante los 42 °C a pH 7.4 y así proceder con los estudios de cargado y liberación.

#### 4.12 Microscopias electrónicas de barrido.

En el Instituto tecnológico de Tijuana se realizaron las microscopias del hidrogel microestructurado y de los microgeles. Se pueden observar como todos los hidrogel son de un tamaño uniforme.

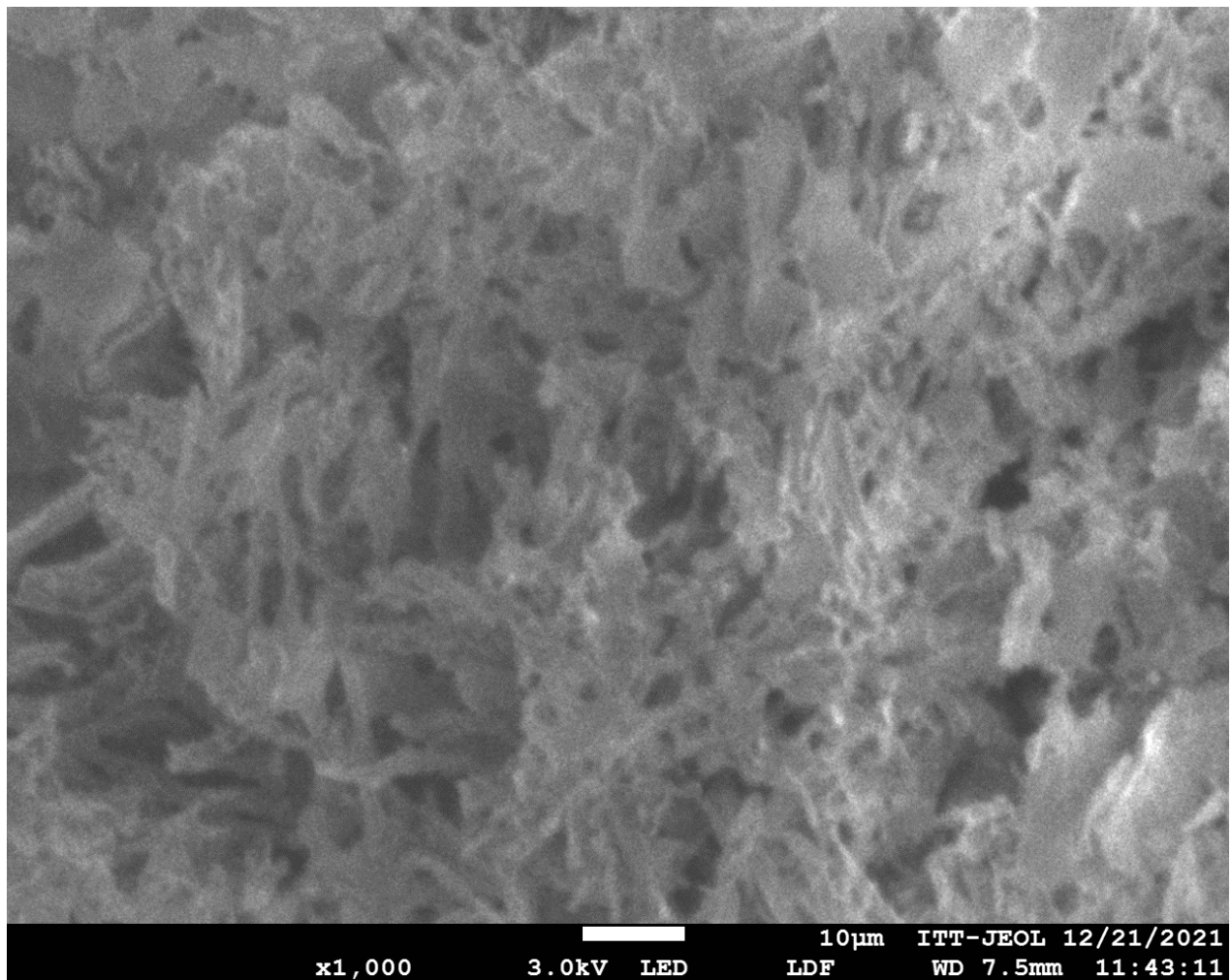


Figura 23. Micrografía FESEM de un hidrogel de PNIPAAm/DMA microestructurado con micropartículas de PNIPAAm/M5. x1,000.

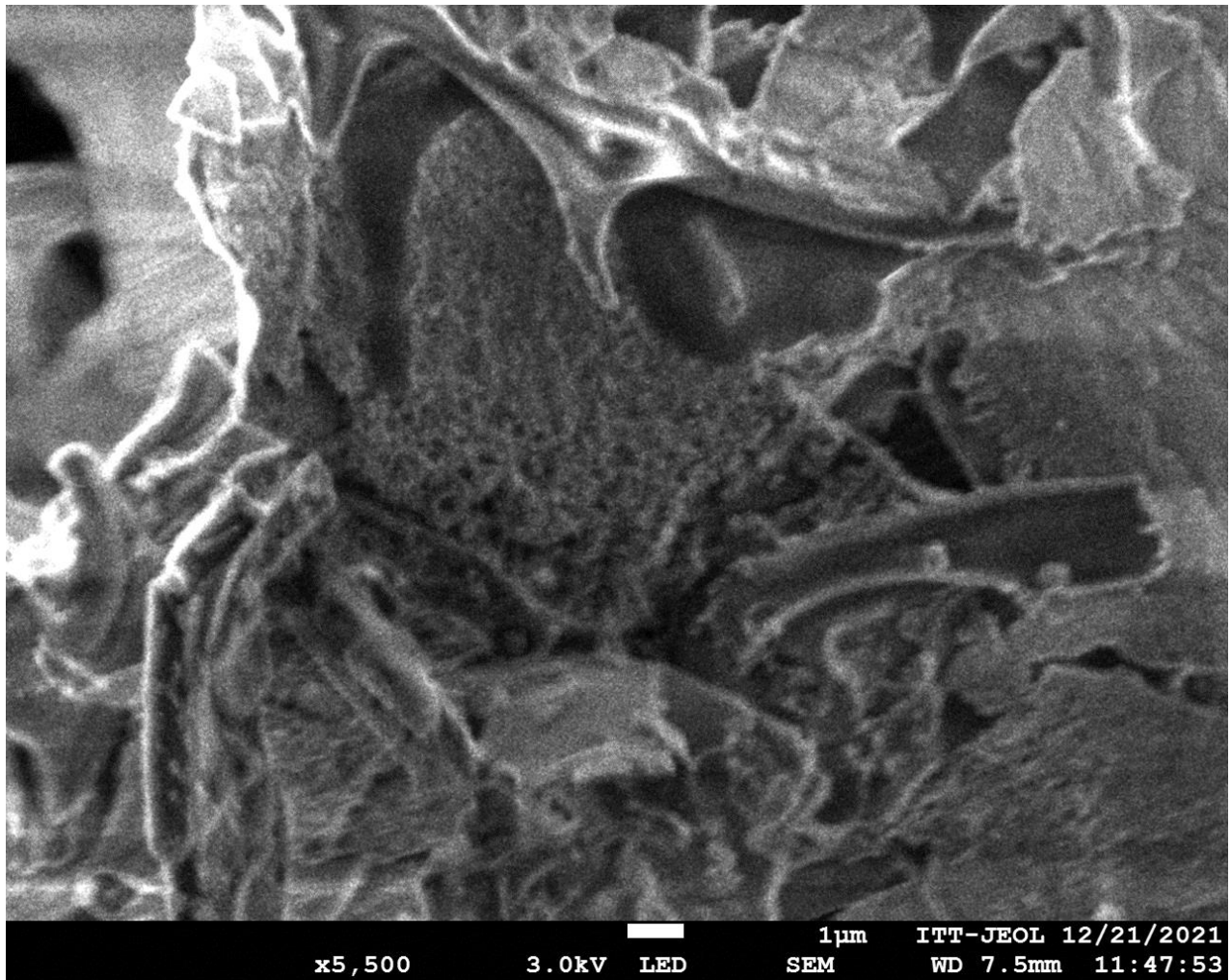


Figura 24. Micrografía FESEM de un hidrogel de PNIPAAm/DMA microestructurado con micropartículas de PNIPAAm/M5. X5,500.

#### 4.13 Etiquetado de Albumina-FITC.

Se etiqueto la albúmina con fluoresceína FITC y se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Tabla 3. Datos del marcado de albumina con fluoresceína FITC.

Tubo	1.1	1.2	2	3
Concentración	47.9mg/ml	80.8mg/ml	54mg/ml	109.42mg/ml
Absorbancia	0.331	0.558	0.392	0.755
nm	280nm	280nm	280nm	280nm

#### 4.14 Cargado de los hidrogeles microestructurados con Albumina-FITC.

Al colocarse 6 discos de hidrogeles microestructurados en dos buffers, uno de pH 5 y pH 7.4 que contenían albumina-FITC a una temperatura de 33°C, adquirieron un color amarillo intenso indicando a simple vista que el hidrogel microestructurados si cargo la proteína como se espera a esta temperatura, en la cual hipotéticamente los microgeles que componen este hidrogel se encuentran en un estado de colapso dejando pasar las moléculas de albumina entre los poros del hidrogel. (Figura 25)

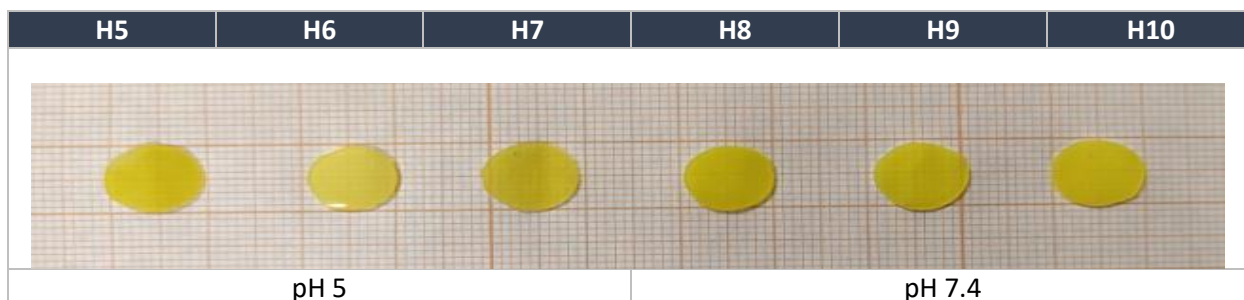


Figura 25. Cargado de los hidrogeles microestructurados al 30% con albumina-FITC en pH 5 y pH 7.4 a 33°C.

#### 4.15 Liberación de Albumina-FITC.

Liberación de los hidrogeles microestructurados al 30% con albumina-FITC de pH 7.4

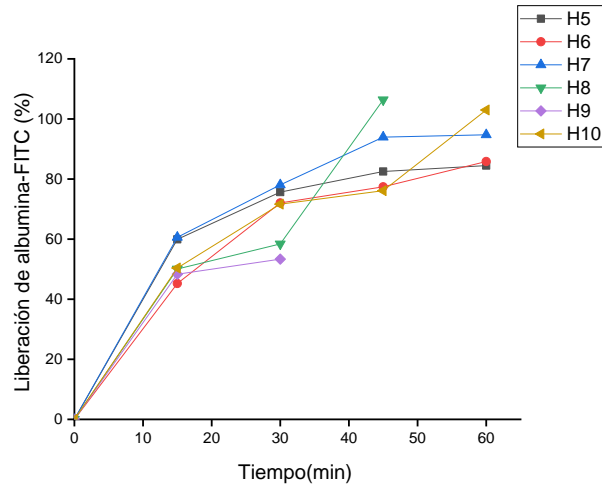


Figura 26. Fracción liberada de albumina a 37 °C, de los cuales los hidrogeles señalados como H5, 56, H7 corresponden al cargado con pH 5 y los hidrogeles señalados como H8, H9, H10 corresponden a los hidrogeles cargados con pH 7.4

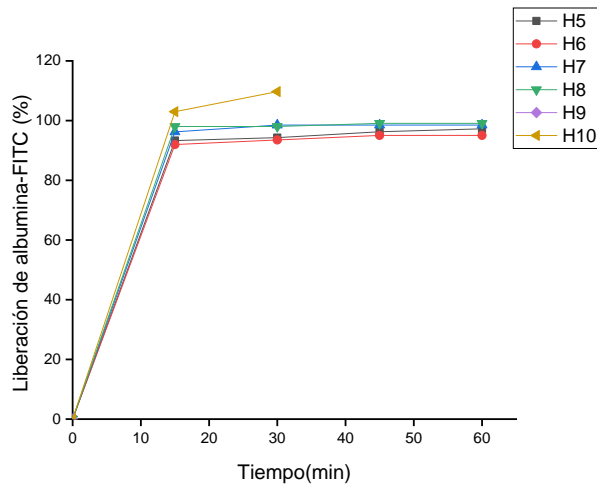


Figura 27. Fracción liberada de albumina a 42 °C, de los cuales los hidrogeles señalados como H5, 56, H7 corresponden al cargado con pH 5 y los hidrogeles señalados como H8, H9, H10 corresponden a los hidrogeles cargados con pH 7.4

## CONCLUSIONES

Los microgeles son mayormente responsivos en pH 5 a partir de 34 °C ya que los polímeros que contienen grupos funcionales ionizables en la red polimérica responden mejor.

Los hidrogeles compuestos por PNIPAAm/DMA presentan un grado de hinchamiento descendiente a una temperatura de 42 °C, lo cual corresponde para matriz polimérica de sistemas de liberación termo-responsivos.

Los hidrogeles microestructurados al 30% responden en menor tiempo a la temperatura que los hidrogeles microestructurados compuestos al 15%. Entre mayor sea el porcentaje de Microgeles, mejor será la respuesta, esto se debe a los poros generados por los Microgeles.

A pesar de que si se logró cargar los hidrogeles con albumina-FITC a 33 °C en pH 5 no se consiguió mantener el cargado dentro de la matriz polimérica del hidrogel microestructurado durante la temperatura de 37 °C y se comenzó a liberar más del 40 % de la fracción liberada. A los 42 °C se liberó la mayor parte de albumina-FITC cargada. Aun no es posible controlar la liberación, pero los hidrogeles microestructurados si son responsivos a 42 °C lo que nos da pauta para analizar la respuesta con hidrogeles microestructurados que contengan Microgeles de mayor tamaño que puedan mantener el contenido cargado a 37 °C.

## REFERENCIAS

- Afroz, S., Afrose, F., Alam, A. K. M. M., Khan, R. A., & Alam, M. A. (2019). Synthesis and characterization of polyethylene oxide (PEO)—N,N-dimethylacrylamide (DMA) hydrogel by gamma radiation. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2(1), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s42114-018-0058-x>
- Auriemma, G., Russo, P., Del Gaudio, P., García-González, C. A., Landín, M., & Aquino, R. P. (2020). Technologies and formulation design of polysaccharide-based hydrogels for drug delivery. *Molecules*, 25(14). <https://doi.org/10.3390/molecules25143156>
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
- Boztepe, C., Künkül, A., & Yüceer, M. (2020). Application of artificial intelligence in modeling of the doxorubicin release behavior of pH and temperature responsive poly(NIPAAm-co-AAc)-PEG IPN hydrogel. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57(February). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101603>
- Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2012). Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.002>
- 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>
- Costa, M. H. B., Quintilio, W., Sant'Anna, O. A., Faljoni-Alário, A., & De Araujo, P. S. (2002). The use of protein structure/activity relationships in the rational design of stable particulate delivery systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(6), 727–730. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000600014>
- Dai, J., Long, W., Liang, Z., Wen, L., Yang, F., & Chen, G. (2018). A novel vehicle for local protein delivery to the inner ear: injectable and biodegradable thermosensitive hydrogel loaded with PLGA nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(1), 89–98. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1373803>
- Doostmohammadi, M., Ameri, A., Mohammadinejad, R., Dehghannoudeh, N., Banat, I. M., Ohadi, M., & Dehghannoudeh, G. (2019). Hydrogels for peptide hormones delivery: Therapeutic and tissue engineering applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 3405–3418. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S217211>
- Ebewele, R. O. (2000). Polymer science and technology. In *Polymer Science and Technology*. [https://doi.org/10.1016/0261-3069\(95\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0261-3069(95)90127-2)

- Gupta, P., Vermani, K., & Garg, S. (2002). Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(10), 569–579. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02255-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02255-9)
- Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638–1649. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>
- Hettiaratchi, M. H., Schudel, A., Rouse, T., García, A. J., Thomas, S. N., Guldberg, R. E., & McDevitt, T. C. (2018). A rapid method for determining protein diffusion through hydrogels for regenerative medicine applications. *APL Bioengineering*, 2(2). <https://doi.org/10.1063/1.4999925>
- Jain, E., Sheth, S., Dunn, A., Zustiak, S. P., & Sell, S. A. (2017). Sustained release of multicomponent platelet-rich plasma proteins from hydrolytically degradable PEG hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(12), 3304–3314. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36187>
- Jiang, T., Shen, S., Wang, T., Li, M., He, B., & Mo, R. (2017). A Substrate-Selective Enzyme-Catalysis Assembly Strategy for Oligopeptide Hydrogel-Assisted Combinatorial Protein Delivery. *Nano Letters*, 17(12), 7447–7454. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b03371>
- Kocak, G., Tuncer, C., & Bütün, V. (2017). PH-Responsive polymers. *Polymer Chemistry*, 8(1), 144–176. <https://doi.org/10.1039/c6py01872f>
- Lee, F., Chung, J. E., & Kurisawa, M. (2009). An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 134(3), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.11.028>
- Li, J., Mooney, D. J., Alvarez-Lorenzo, C., Grinberg, V. Y., Burova, T. V., Concheiro, A., You, J. O., Almeda, D., Ye, G. J. C., Auguste, D. T., Maitra, J., Shukla, V. K., Afroz, S., Afrose, F., Alam, A. K. M. M., Khan, R. A., Alam, M. A., Boztepe, C., Künkül, A., ... Müller S, A. J. (2020). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 4(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101603>
- Maga, H., Cornejo-bravo, J. M., & Cordova-guerrero, I. (2017). *Journal of Drug Delivery Science and Technology pH-dependent release of antihypertensives from complexes with poly ( carboxyalkyl methacrylamides )*. 39, 508–515.
- Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, 30(2), 3–5. <https://doi.org/10.1002/adfm.201902634>
- Michida, N., Hayashi, M., & Hori, T. (1998). Comparison of event related potentials with and without hypnagogic imagery. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 52(2), 145–147. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1998.tb00997.x>
- Miller, S. E., Yamada, Y., Patel, N., Suárez, E., Andrews, C., Tau, S., Luke, B. T., Cachau, R. E., & Schneider, J. P. (2019). Electrostatically Driven Guanidinium

- Interaction Domains that Control Hydrogel-Mediated Protein Delivery in Vivo. *ACS Central Science*, 5(11), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00501>
- Müller S, A. J. (2015). Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales: Editorial. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 35(2), 150.
- Palomino, K., Cornejo-Bravo, J. M., Magaña, H., & Serrano-Medina, A. (2018). Microstructured hydrogels with modulated transition temperature for positive control release. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 13(1), 141–154.
- Palomino, K., Suarez-Meraz, K. A., Serrano-Medina, A., Olivas, A., Samano, E. C., & Cornejo-Bravo, J. M. (2015). Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery. *Journal of Polymer Research*, 22(10). <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0841-0>
- Palomino, Kenia, Magaña, H., Meléndez-López, S. G., Cornejo-Bravo, J. M., Serrano-Medina, A., Alatorre-Meda, M., Rodríguez-Velázquez, E., & Rivero, I. (2019). Loading and release of a model high-molecular-weight protein from temperature-sensitive micro-structured hydrogels. *MRS Communications*, 9(3), 1041–1045. <https://doi.org/10.1557/mrc.2019.87>
- Park, Y., Hwang, M., Kim, M., Park, E., Noda, I., & Jung, Y. M. (2021). Characterization of the phase transition mechanism of P(NiPAAm-co-AAc) copolymer hydrogel using 2D correlation IR spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 252, 119525. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119525>
- Phan, V. H. G., Thambi, T., Gil, M. S., & Lee, D. S. (2017). Temperature and pH-sensitive injectable hydrogels based on poly(sulfamethazine carbonate urethane) for sustained delivery of cationic proteins. *Polymer*, 109, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.12.039>
- Preparation, P., & Reaction, L. (2004). *Fluorescein-EX Protein Labeling Kit ( F10240 ) Storage upon receipt : Component D*, 1–4. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp10240.pdf>
- Prusty, K., & Swain, S. K. (2021). Polypropylene oxide/polyethylene oxide-cellulose hybrid nanocomposite hydrogels as drug delivery vehicle. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(9), 1–16. <https://doi.org/10.1002/app.49921>
- Sabaa, M. W., Hanna, D. H., Abu Elella, M. H., & Mohamed, R. R. (2019). Encapsulation of bovine serum albumin within novel xanthan gum based hydrogel for protein delivery. *Materials Science and Engineering C*, 94, 1044–1055. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.040>
- Vashist, A., Vashist, A., Gupta, Y. K., & Ahmad, S. (2014). Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(2), 147–166. <https://doi.org/10.1039/c3tb21016b>
- Xiang, D., Wu, X., Cao, W., Xue, B., Qin, M., Cao, Y., & Wang, W. (2020). Hydrogels With Tunable Mechanical Properties Based on Photocleavable Proteins. *Frontiers*

*in Chemistry*, 8(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00007>

You, J. O., Almeda, D., Ye, G. J. C., & Auguste, D. T. (2010). Bioresponsive matrices in drug delivery. *Journal of Biological Engineering*, 4(November). <https://doi.org/10.1186/1754-1611-4-15>

5.1 Curva de calibración

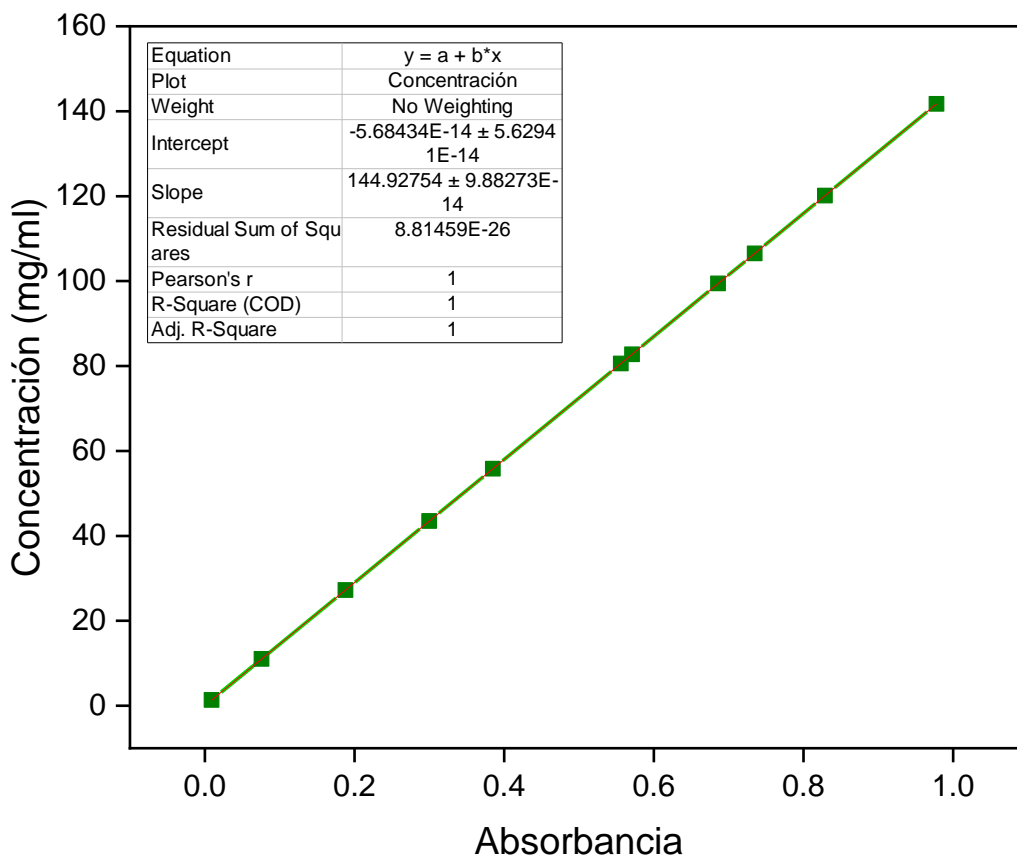


Figura 28. Curva de calibración de albumina-FITC