



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

**“Geles microestructurados de *N*-isopropilacrilamida
con ajuste de la temperatura de transición para la
liberación de macromoléculas”**

TESIS

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Por

Q.F.B. KENIA PALOMINO VIZCAINO

Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana B.C.

Agosto de 2014

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

FOLIO No. 124

Tijuana, B. C., a 25 de julio de 2014

C. Kenia Palomino Vizcaíno
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

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

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

quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: "Geles microestructurados de N-isopropilacrilamida con ajuste de la
temperatura de transición para la liberación de macromoléculas"

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

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCION
- III.- TEORIA GENERAL
- IV.- EXPERIMENTAL
- V.- RESULTADOS Y DISCUSION
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- REFERENCIAS
- VIII.- ANEXOS

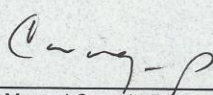
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



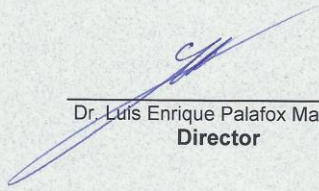
FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA



Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Director/Secretario



Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas, acrónimos y simbología	vi
Índice de figuras	viii
Índice de ecuaciones	x
Índice de tablas	x
CAPÍTULO I RESUMEN	1
CAPÍTULO II INTRODUCCIÓN	5
II.1. ANTECEDENTES	6
II.2. JUSTIFICACIÓN	9
II.3. OBJETIVO GENERAL	10
II.4. OBJETIVOS PARTICULARES	10
CAPÍTULO III TEORÍA GENERAL	11
III.1 SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	12
III.2. POLÍMEROS INTELIGENTES: HIDROGELES	14
III.2.1. Polímeros	14
III.2.2. Copolímeros	14
III.2.3. Hidrogeles	15
III.2.4. Polímeros inteligentes	17
III.2.4.1. Polímeros inteligentes sensibles a la temperatura	17
III.3. GRADO DE HINCHAMIENTO	20
III.3.1 Factores que afectan al hinchamiento	21
III.4. MICROPARTÍCULAS	21
III.5. <i>N</i> -ISOPROPILACRILAMIDA	21
III.5.1. NIPAAm	21
III.5.2. Geles de NIPAAm: materiales sensibles a la temperatura	22

CAPÍTULO IV	EXPERIMENTAL	25
IV.1.	EQUIPOS Y REACTIVOS	26
IV.2.	PURIFICACIÓN DE <i>N</i> -ISOPROPILACRILAMIDA	28
IV.3.	SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS CON NIPAAm Y COPOLIMEROS	28
IV.4.	PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON MP CON MOLÉCULAS IN SITU	29
IV.4.1.	Hidrogeles con MP con GFP IN SITU	29
IV.4.1.1.	Liberación de hidrogeles con GFP	31
IV.4.2.	Hidrogeles con MP con Cit C IN SITU	32
IV.4.2.1.	Liberación de Hidrogeles con Cit C	32
IV.5.	PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON AJUSTE DE TEMPERATURA	32
IV.6.	ESTUDIO DEL HINCHAMIENTO RESPECTO A LA TEMPERATURA	34
IV.7.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO	34
IV.8.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE COLAPSO	35
IV.9.	PREPARACION DE HIDROGELES DE NIPAAm/DMA(20%) CON DIF. MP's	36
IV.10.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE COLAPSO/HINCHAMIENTO	37
IV.11.	ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS	38
IV.11.1.	Liberación de Vitamina B12	38
IV.11.1.1.	Cargado de geles con Vitamina B12	38
IV.11.1.2.	Estudio de liberación de Vitamina B12	39
IV.11.2.	Liberación de Citocromo C	41
IV.11.2.1.	Cargado de geles con Citocromo C	41
IV.11.2.2.	Estudio de liberación de Citocromo C	41
IV.11.3.	Liberación de Albúmina marcada con Fluoresceína	41
IV.11.3.1.	Marcaje de albúmina con fluoresceína	41
IV.11.3.2.	Cargado de hidrogeles con albúmina marcada	42
IV.11.3.3.	Estudio de liberación de albúmina marcada	43
CAPÍTULO V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
V.1.	SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS	45
V.2.	PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON MP CON MOLECULAS IN SITU	46
V.2.1.	Hidrogeles con MP de NIPAAm cargado con GFP IN SITU	46
V.2.1.1.	Liberación de hidrogeles con GFP IN SITU	48
V.2.1.2.	Evaluación de la liberación de GFP	48
V.2.2.	Hidrogeles con MP de NIPAAm cargado con Cit C IN SITU	48
V.2.2.1.	Liberación de hidrogeles con Cit C IN SITU	50
V.2.2.2.	Evaluación de liberación de Cit C	50

V.3.	PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON AJUSTE DE TEMPERATURA	54
V.3.1.	Estudio de hinchamiento respecto a la temperatura	54
V.3.2.	Estudio de la cinética de hinchamiento	56
V.3.3.	Estudio de la cinética de colapso	57
V.4.	PREPARACION DE HIDROGELES DE NIPAAm/DMA(20%) CON DIF. MP's	58
V.4.1.	Estudio de la cinética de hinchamiento	59
V.4.2.	Estudio de la cinética de colapso	60
V.4.3.	Estudio de la cinética de colapso/hinchamiento	63
V.5.	ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS	66
V.5.1.	Liberación de hidrogeles con Vitamina B12	66
V.5.1.1.	Concentración de cargado con Vitamina B12	66
V.5.1.2.	Estudio de liberación de Vitamina B12	67
V.5.2.	Liberación de hidrogeles con Citocromo C	71
V.5.2.1.	Concentración de cargado con Citocromo C	71
V.5.2.2.	Evaluación de cinética de liberación de Citocromo C	72
V.5.3.	Liberación de hidrogeles con Albúmina	77
V.5.3.1.	Concentración de cargado con Albúmina	77
V.5.3.2.	Evaluación de cinética de liberación de Albúmina	77
CAPÍTULO VI	CONCLUSIONES	83
CAPÍTULO VII	REFERENCIAS	88
CAPÍTULO VIII	ANEXOS	92

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIMBOLOGÍA

λ	Longitud de onda
AAm	Acrilamida
APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
BIS	<i>N,N'</i> -metilbisacrilamida
cm	Centímetro
Cit C	Citocromo C
DMA	Dimetilacrilamida
DLS	Dispersión de luz dinámica
Da	Dalton
EDGMA	Etilenglicol dimetilacrilato
FITC	Fluoresceína de isotiosianato
FLM	Formas farmacéuticas de liberación modificada
GFP	Proteína verde fluorescente
kDa	Kilo dalton
LCST	Temperatura critica inferior de solución
M_t	Cantidad liberada de un fármaco a un tiempo t
M_∞	Cantidad total de fármaco en el gel
mm	milímetros

MP	Micropartículas
Min	Minutos
mg/ml	miligramo por mililitro
NIPAAm	<i>N</i> -isopropilacrilamida
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
<i>Q</i>	Grado de hinchamiento por relación de pesos
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -tetrametilendiamina
Ttr	Temperatura de transición
UV/Vis	Ultravioleta/visible
Vit B12	Vitamina B12
W_h	Peso del gel hinchado
W_s	Peso del gel seco
%	Porcentaje
°C	grados centígrados

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Página
1	Cinética de liberación pulsátil	13
2	Representación de un copolímero alternado	15
3	Representación de un copolímero al azar	15
4	Representación de un copolímero en bloque	15
5	Descripción esquemática de tipos de entrecruzamiento de geles	17
6	Representación esquemática del efecto térmico de un hidrogel que contiene fármaco	18
7	Representación esquemática del comportamiento reversible del gel hinchamiento/colapso	19
8	Poli (<i>N</i> -isopropilacrilamida)	22
9	Representación de la formación de un gel	23
10	Representación esquemática de la preparación de geles entre placas de vidrio	30
11	Representación gráfica de la reacción de un gel con ajuste de temperatura	33
12	Viales que contienen los discos de cada diferente gel	37
13	Sistema empleado para los estudios de liberación	40
14	Temperatura de transición de micropartículas	46
15	Hidrogel de NIPAAm cargado con GFP IN SITU	47
16	Hidrogel de NIPAAm cargado con Cit C de 1mg/ml y 10mg/ml IN SITU	49
17	Liberación de Cit C de 1mg/mL cargados IN SITU a 25°C	51
18	Liberación de Cit C de 10mg/mL cargados IN SITU a 25°C	52
19	Liberación de Cit C de 10mg/mL cargados IN SITU a 25°C a 42°C	53
20	Grado de hinchamiento de gel de NIPAAm-co respecto a la temperatura	55

21	Cinética de hinchamiento del gel NIPAAm-co-DMA a 25°C	56
22	Cinética de colapso del gel NIPAAm/DMA(20%) a 42°C	58
23	Cinética de hinchamiento de hidrogeles NIPAAm/DMA(20%) con diferentes MP	59
24	Cinética de colapso del gel de NIPAAm/DMA(20%) de 25°C a 42°C	61
25	Cinética de colapso del gel de NIPAAm/DMA(20%) de 37°C a 42°C	62
26	Cinética de colapso/hinchamiento del gel de NIPAAm/DMA(20%) de 25°C a 42°C	64
27	Cinética de colapso/hinchamiento del gel de NIPAAm/DMA(20%) de 37°C a 42°C	65
28	Cinética de liberación de Vit B12 NIPAAm/DMA(20%) dif MP en ciclos de 25°C a 42°C	69
29	Cinética de liberación de Vit B12 NIPAAm/DMA(20%) dif MP en ciclos de 37°C a 42°C	70
30	Cinética de liberación de Cit C NIPAAm/DMA(20%) dif MP en ciclos de 25°C a 42°C	74
31	Cinética de liberación de CitC NIPAAm/DMA(20%) dif MP en ciclos de 37°C a 42°C	75
32	Cinética de liberación de albúmina marcada en NIPAAm/DMA (20%) con 15%MP NIPAAm a 37°C con sol de cargado 6mg/ml.	78
33	Cinética de liberación de albúmina marcada en NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm en ciclos 25°C a 42°C con sol. De 6mg/ml	79
34	Cinética de liberación de albúmina marcada en NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm en ciclos 37°C a 42°C con sol. De 6mg/ml	80
35	Cinética de liberación de albúmina marcada en NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm en ciclos 37°C con sol. De 30mg/ml	81

LISTA DE ECUACIONES

No.		Página
1	Grado de hinchamiento	20
2	Derivada de Q	42
3	Fracción libre	48

ÍNDICE DE TABLA

Tablas		Página
1	Concentraciones de monómeros en las micropartículas	29
2	Hidrogeles de NIPAAm y copolímeros en diferentes combinaciones	33
3	Porcentajes de las MP en el hidrogel NIPAAm/DMA(20%)	36
4	Tamaño y temperatura de transición de micropartículas	45
5	Cargado de GFP en cada hidrogel	47
6	Cargado de Cit C con 1mg/ml IN SITU en cada hidrogel	49
7	Cargado de Cit C con 10mg/ml IN SITU en cada hidrogel	49
8	Cargado de Vit B12 en dos temperaturas 25°C y 37°C	67
9	Cargado de Cit C en dos temperaturas 25°C y 37°C	72
10	Cargado de Albúmina marcada cargada a 32°C	77

Agradecimientos

Esta tesis y este logro no son de una persona, ya que sin el apoyo de la familia seria mas dificil, sin embargo esta tesis no podría realizarla sin el ejemplo de mis padres Rogelio y Patricia que siempre me guían por el buen camino, lo más importante son los valores y el compromiso de siempre trabajar para ser mejor que nada es imposible y que el objetivo que desee puede ser alcanzado.

A mi hermano Giovanni por su entrega, por ser un ejemplo a seguir y demostrar que nunca hay imposibles, que todo es alcanzable y que siempre hay algo más.

A mis amigos de posgrado Carolina, Analy, Sandra, Dalia, Ayla, Rita, Brenda, Hector, Victor, y Paty porque ellos son un apoyo, una familia.

Al padre de ciencia a Dr. José Manuel Cornejo por el apoyo, tolerancia, confianza, por transmitir sus conocimientos por ser un ejemplo a seguir.

A la Universidad Autónoma de Baja California, en la Facultad de Ciencias Química e Ingeniería, en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e ingeniería y al Laboratorio de Biofarmacia por abrir las puertas de las instalaciones para lograr llevar a término mi formación y este trabajo. A CONACYT por la beca otorgada.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Tijuana bajo la dirección del profesor:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Este trabajo fue apoyado por CONACYT (Apoyo Complementario a Investigadores en Proceso de Consolidación 2008/9027). Y SEP_CONACYT (CB2010-1-157173)

CAPÍTULO I

RESUMEN

RESUMEN

El presente trabajo de investigación incluye la preparación de hidrogeles en base a *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm); este monómero se eligió debido a sus cualidades principalmente termosensibles. Su comportamiento se basa en el colapso o en el hinchamiento del gel cuando su temperatura se encuentra por arriba o por debajo de su temperatura de transición (T_{tr}) respectivamente. Con este tipo de geles se pretende la liberación controlada por medio de pulsos esto es aprovechando las diferencias en la cinética de colapso, utilizando hidrogeles de NIPAAm con diferentes porcentajes de micropartículas (MP's) tienen una temperatura de transición marcada a 32°C la cual es reportada por diferentes autores, esta cuenta con una buena capacidad de hinchamiento que es regida en parte por la cantidad de entrecruzante que contiene, y lo más importante es que se comprobó que las micropartículas ayudan a que el hidrogel muestre un colapso en menos de 10min.

Este sistema tiene deficiencias debido a que se colapsa lejos de la temperatura corporal de 37°C lo cual nos motiva a pensar en una forma de ajustar la temperatura de transición de estos y lograr considerarlo un sistema de liberación adecuado para la liberación de proteínas las cuales puedan ser cargadas en sistemas de liberación y poder tratar enfermedades que así lo requieran actualmente.

Una vez identificado el problema se procedió a la formulación de micropartículas de NIPAAm con dos diferentes copolímeros siendo acrilamida (AAm) y *N,N*-

dimetilacrilamida (DMA), logrando un ajuste de temperatura en las MP de NIPAAm/AAm(15%) y NIPAAm/AAm(20%) de 38°C y 40°C respectivamente. Mostrando los mayores tamaños de 1023nm y 804nm respectivamente, con lo cual entre mayor sea la MP mayor será el poro al momento del colapso. Se prepararon hidrogeles con NIPAAm y copolimerizado en busca del ajuste de temperatura, donde se logró obtener el hidrogel de NIPAAm/DMA(20%) que mostró una temperatura de transición de 38°C. Una vez determinado el hidrogel y las MP elegidas se realizaron diferentes formulaciones variando los 3 tipos de MP elegidas y los porcentajes de las mismas; se prepararon con 3% de entrecruzante, 1% de APS como iniciador y 1% de TEMED como catalizador.

Una vez concluida la síntesis, se procedió a estudiar el comportamiento del hinchamiento el cual se determinó por el grado de hinchamiento (Q) en diferentes circunstancias, como son la cinética de hinchamiento, de colapso, y de hinchamiento/colapso, los cuales se realizaron en agua y se logró verificar la capacidad de cada gel para absorber el disolvente a diferentes temperaturas, siendo el de 30%MP NIPAAm/AAm(20%) el que tiene una mayor capacidad de hinchamiento y el de 15%MP NIPAAm el que tiene una menor capacidad. Los geles colapsan rápidamente en menos de 10 min, con excepción del gel 15%MP NIPAAm/AAm(15%) el cual tiene un colapso paulatino y todos muestran una capacidad de hinchamiento y colapso con repetitividad y capacidad de pasar por los ciclos conservando su estructura.

Se realizaron liberaciones con Vit B12, Citocromo C, proteína verde fluorescente (GFP) y albúmina marcada con fluoresceína los cuales se liberaron en ciclos de

temperatura de 25°C a 42°C y 37°C a 42°C, donde nos muestra que para Vit B12 su cargado es poco, no responde ante los estímulos y se libera rápidamente.

El citocromo C manifiesta una mayor capacidad de cargado y su liberación demuestra cierto control ante los estímulos. La Albúmina nos muestra que puede ser cargada y liberada a pesar de ser una macromolécula.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. ANTECEDENTES

En los últimos años la investigación farmacéutica se ha centrado en el desarrollo de nuevos y más sofisticados sistemas de liberación de fármacos, con la finalidad de mejorar al máximo los tratamientos terapéuticos debido a que la distribución sistémica de los fármacos provoca reacciones adversas y toxicidad asociada a los mismos, como consecuencias se busca diseñar y sintetizar materiales inteligentes capaces de responder a diferentes reacciones fisiológicas¹, liberando su carga en su sitio de acción, en la cantidad adecuada, tiempo preciso y a la velocidad deseada.²

Se reportan diferentes sistemas de liberación de fármacos de los cuales se han estudiado nanopartículas, micropartículas, microesferas, microcapsulas³, así como la modalidad de sistemas de liberación sostenida, controlada y pulsátil.

Los materiales o polímeros inteligentes se basan en la respuesta a ligeros cambios en su entorno como temperatura, pH, luz, campo eléctrico, moléculas biológicas, etc., sufriendo cambios drásticos en sus propiedades.⁴⁻⁷ Este comportamiento único que muestra el sistema, sumados a buenas propiedades mecánicas, alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, permiten aplicaciones tecnológicas en química, medicina, medio ambiente, agricultura y en otros campos de la industria.^{8,9} El desarrollo de polímeros inteligentes se ha incrementado debido al interés por implementar sistemas de liberación de fármacos con localización o direccionamiento específico.¹⁰

En la actual generación de materiales inteligentes se busca que los materiales sean suaves y húmedos, tales como fluidos electrorreológicos, fluidos magnéticos y geles de polímeros.⁸

El monómero de N-isopropilacrilamida (NIPAAm), es uno de los monómeros más estudiados en la actualidad ya que es un monómero sensible a la temperatura, este como hidrogel tiene termosensibilidad negativa, es decir, que se reduce o colapsa al aumentar la temperatura^{8, 11}, cuya transición se encuentra alrededor de 32°C.¹¹⁻¹⁵ Cuando estos hidrogeles de NIPAAm se someten a una temperatura por debajo de 32°C se comportan como un material hidrófilo, esto provoca su hinchamiento, y por encima de esta se comporta como hidrófobo, originando que la estructura se colapse sobre sí misma, esto origina que el contenido de la estructura tridimensional sea desplazado al exterior.¹⁶ NIPAAm es un monómero muy práctico, ya que es fácil de alterar de sus propiedades al ser copolimerizado con monómeros hidrofílicos o hidrofóbicos, así como con sales o tensoactivos.¹⁶

NIPAAm cuenta con propiedades de hinchamiento a través de la absorción de grandes cantidades de agua o soluciones acuosas, esta no es solo una propiedad física si no que depende de la naturaleza química del polímero así como el tipo de entrecruzamiento,¹⁷ esta propiedad los convierte en materiales de enorme interés, en medicina por su aplicación como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos, dispositivos para diagnóstico, substrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, membranas para hemodiálisis, sistemas terapéuticos biodegradables, lentes de contacto, implantes, entre otras aplicaciones.¹⁸

La NIPAAm presenta grandes deficiencias como gel, que le impiden llegar a ser considerado por si solo como un sistema de liberación, ya que al colapsarse por arriba de su T_{tr} forma una piel en el exterior y bloquea la salida del disolvente. Este problema atrajo

el interés en investigar y mejorar estos geles de NIPAAm, una investigación propuso la incorporación de sales inorgánicas con la intención de formar macro poros en el gel los cuales evitarían la formación de la piel y con ello el bloqueo de la liberación, dando como resultado una pequeña liberación pero surgiendo el mismo problema ya que los poros formados se cierran a altas temperaturas, causando un bloqueo, ocasionando el mismo inconveniente en la liberación.¹⁹ Esto nos condujo a la búsqueda de nuevas alternativas para lograr mejorar este sistema de liberación.

En el laboratorio de Biofarmacia de la Universidad Autónoma de Baja California, se sintetizaron micropartículas (MP) de NIPAAm las cuales se analizaron por medio de dispersión de luz dinámica (DLS), la cual mostró un tamaño de partícula de 600nm a 25°C y una Ttr de 32°C. Estas fueron colocadas en los hidrogeles para evitar la formación de capa exterior. Dependiendo de los porcentajes utilizados en los hidrogeles se logró establecer que a mayor contenido de MP mayor hinchamiento esto debido a la cantidad de poros que se forman, de igual manera la capacidad de colapso es mejorada por las MP's. Las liberaciones mostraron que son capaces de liberar macromoléculas al momento del colapsarse.²⁰

II.2. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Biofarmacia en FCQI de UABC, actualmente se realizan trabajos de investigación de síntesis de monómeros para el desarrollo de vehículos farmacéuticos a partir de polímeros sensibles a la temperatura.

Una de las grandes aplicaciones para estos materiales es el principal interés de generar un sistema de liberación de fármacos pulsátil, esto ha impulsado el mejoramiento en los geles de NIPAAm, ya que pueden llegar a ser un vehículo adecuado para liberación de proteínas. En la actualidad se contempla la utilización de las proteínas y péptido como agentes terapéuticos y con ello ser capaces de combatir enfermedades mal controladas con los sistemas actuales, sin embargo el desarrollo de productos farmacéuticos de este tipo ha tenido diferentes problemáticas como estabilidad, baja biodisponibilidad, así como vida corta de proteínas y péptidos.¹¹

En este proyecto se pretende obtener sistemas de liberación pulsátil de macromoléculas en temperaturas superiores a la corporal. La propuesta se basa en mejorar la formulación de los geles de NIPAAm para lo cual se proponen dos métodos: a) Iniciando con el cargado de macromoléculas de manera *in situ* con las micropartículas de NIPAAm, b) mejorar las micropartículas a través de la incorporación de un copolímero que aumente la T_{tr} de las micropartículas con el fin de lograr una temperatura de liberación superior a la corporal y utilizarse para un control negativo de la liberación.

II.3. OBJETIVOS GENERALES

Desarrollar un sistema de liberación pulsátil microestructurado sensible a la temperatura con la capacidad para liberar macromoléculas de manera pulsada con una velocidad adecuada y mostrando un control positivo de la liberación.

II.4. OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Preparación de hidrogeles cargados con macromoléculas de manera *in situ*
- b. Preparar micropartículas de NIPAAm copolimerizado con ajuste de temperatura superior a la corporal.
- c. Preparar hidrogeles con copolímeros con un ajuste de temperatura mayor a 37°C
- d. Preparar hidrogeles de NIPAAm/DMA(20%) con diferentes porcentajes y tipos de micropartículas.
- e. Estudiar el grado de hinchamiento con respecto a la temperatura y determinar la temperatura de transición.
- f. Estudiar las cinéticas de hinchamiento, colapso e hinchamiento/colapso de estos a diferentes temperaturas.
- g. Estudio de cargado de los hidrogeles con diferentes macromoléculas en diferentes ambientes.
- h. Estudio de la liberación pulsátil de los hidrogeles con macromoléculas con ciclos de temperaturas (25-42°C y 37-42°C).

CAPÍTULO III
TEORÍA GENERAL

III.1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

En las últimas décadas, la investigación farmacéutica se ha centrado en el desarrollo de nuevos y más sofisticados sistemas de liberación controlada, con la finalidad de racionalizar al máximo los tratamientos terapéuticos,²¹ esto ha sido impulsado por áreas como química de polímeros, biotecnología y nanotecnología entre otras.²²

El éxito de estos sistemas de liberación controlada, se debe a los beneficios económicos y terapéuticos que estos ofrecen, principalmente por la miniaturización de los dispositivos, el control de tiempo de liberación y ubicación de los sistemas en lugares específicos del organismo.²³

Las formas farmacéuticas de liberación modificada (FLM) son aquellas diseñadas de tal manera que se modifica la velocidad o el lugar de liberación del principio activo respecto a las formas farmacéuticas de liberación inmediata del mismo principio activo. Su uso no está justificado a menos que ofrezcan ventajas sobre las formas de liberación inmediata, generalmente más baratas. Un medicamento formulado como FLM debe demostrar ensayos clínicos controlados una eficacia similar o superior o bien un perfil de seguridad/tolerabilidad más favorable a igualdad de eficacia, comparado con la forma de liberación inmediata.²⁴

Sistema de liberación controlada.- Este se relaciona con otros términos como liberación prolongada, liberación sostenida, sistemas dirigidos entre otros. Esto nos llevan a un punto en que coinciden en que son sistemas diseñados para controlar la concentración del principio activo, prolongar el efecto terapéutico, o bien tratar de

eliminar o reducir efectos secundarios, buscando que la concentración del fármaco se mantenga constante en el organismo.²⁵⁻²⁷

Sistema de liberación pulsátil.- También llamados sistemas de liberación por pulsos, o secuencial. Su objetivo principal es liberar el principio activo en varias fases, una de forma inmediata y la otra al cabo de un tiempo determinado. Este mecanismo es de mayor interés ya que se puede hacer coincidir la liberación de algunos principios activos con determinados ciclos circadianos hormonales.^{11, 25}

Algunos ejemplos de los fármacos que en la actualidad existen por medio de liberación pulsátil son Pulsincap®, Ritalin®, and Pulsys®.^{25, 28} En la Figura 1 se observa un esquema de la cinética de liberación pulsátil.

El objetivo de cualquier tipo de sistema de liberación, es suministrar la cantidad adecuada de fármaco en el lugar apropiado del organismo, con la que alcance rápidamente la concentración de fármaco deseado y durante el tiempo necesario.²⁹

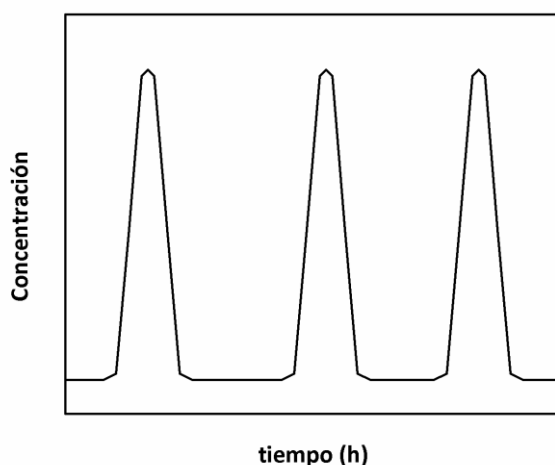


Figura 1.- Representación de una liberación pulsátil.

III.2. POLÍMEROS INTELIGENTES: HIDROGELES

III.2.1. Polímeros

Los polímeros se producen por la unión en secuencia de cientos de miles de moléculas denominadas monómeros, una unidad después de la otra, para formar largas cadenas de las formas más diversas, en algunos casos son lineales, ramificadas o interconectadas formando retículos tridimensionales. La unidad repetitiva del polímero es usualmente equivalente o casi equivalente al monómero o material de partida del que se forma.³⁰

III.2.2. Copolímeros

Cuando un polímero se forma por medio de uniones entre sí de un solo monómero, se le conoce como homopolímero, mientras que un copolímero es una macromolécula compuesta por dos o más unidades repetitivas distintas, que se pueden unir de diferentes formas por medio de enlaces químicos. Estas combinaciones de monómeros se realizan para modificar las propiedades de los polímeros y lograr nuevas aplicaciones. Al variar las proporciones de los monómeros, las propiedades de los copolímeros varían también de manera que el proceso de copolimerización permite hasta cierto punto sintetizar polímeros con propiedades y características deseadas.³¹

Copolímeros alternados: es cuando dos monómeros están dispuestos según un ordenamiento alternado, el polímero es denominada copolímero alternado, Figura 2.

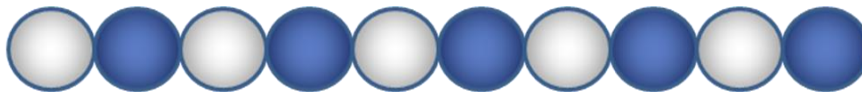


Figura 2. Representación de un copolímero alternado

Copolímeros al azar: en un copolímero al azar, los dos monómeros pueden seguir cualquier orden Figura 3.



Figura 3. Representación de un copolímero al azar

Copolímeros de bloque: en un copolímero de bloque, las cadenas poliméricas están formadas por largas secuencias (bloques) de una misma unidad monomérica covalentemente unidas a otra larga secuencia de otra unidad monomérica diferente. Los bloques pueden estar conectados en diversas formas, como por ejemplo dibloques o tribloques. Un copolímero dibloque puede ser imaginado como dos homopolímeros unidos por sus extremos, Figura 4.

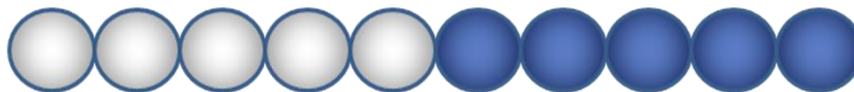


Figura 4. Representación de un copolímero en bloque

III.2.3. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales hidrófilas que son químicamente reticulados o enredados físicamente con una excelente capacidad de hinchamiento con agua. A nivel molecular, el agua en un hidrogel actúa como vínculo a grupos hidrófilos

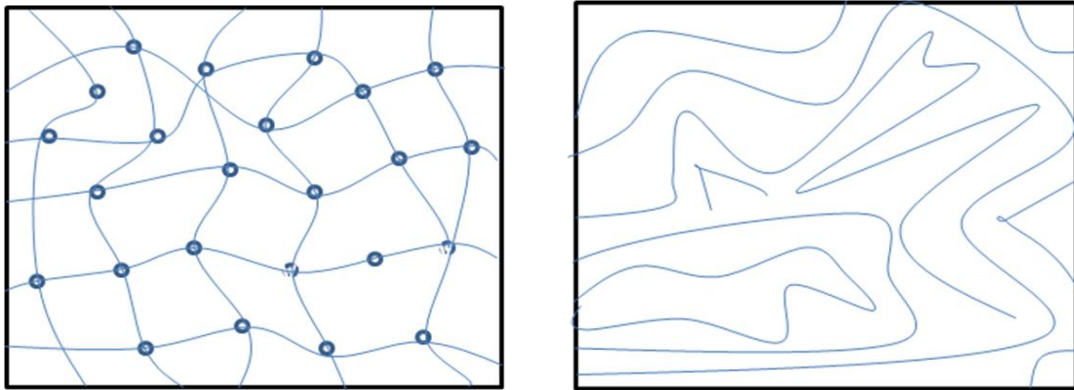
polares como agua o llena el espacio entre las cadenas de la red, poros o huecos como "agua libre". Los hidrogeles se caracterizan como material blando con alto contenido de agua, que es similar al tejido blando, por lo que tienen buenas propiedades biocompatibles y se han explotado en muchos campos tales como productos farmacéuticos, cultivo celular e implantes biomédicos.^{32, 33}

Los geles se dividen en dos categorías principales basándose en el tipo de enlace que los forman: a) geles entrecruzados químicamente y b) geles entrecruzados físicamente.³⁴

a) Geles entrecruzados químicamente.- Son redes tridimensionales que se encuentran entrecruzadas covalentemente. Este tipo de geles se forman por un enlace muy fuerte no pueden disolverse en agua o cualquier otro tipo de disolvente, estos no son reversibles con la temperatura, una vez rotos los enlaces no se pueden volver a formar.³⁴

Figura 5a

b) Geles entrecruzados físicamente.- Este tipo de geles (también llamados pseudo geles) son redes tridimensionales que se encuentran unidas por fuerzas asociativas capaces de formar un entrecruzamiento no covalente. Estas interacciones incluyen fuerzas moleculares secundarias como: fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, atracciones iónicas, interacciones hidrofóbicas, entre otras. Este tipo de geles eventualmente se disolverán en agua o cualquier otro disolvente y además se pueden fundir al calentarlos.³⁴ Figura 5b



a) Gel entrecruzado químicamente.

b) gel entrecruzado físicamente

Figura 5.- Descripción esquemática de tipos de entrecruzamiento de geles.

III.2.4. Polímeros inteligentes

Son polímeros capaces de reponerse a cambios dramáticos de propiedades como respuesta a pequeños cambios del ambiente, los sistemas más estudiados desde un punto de vista biomédico son aquellos sensibles al pH o la temperatura. El cuerpo humano presenta variaciones de pH a lo largo del tracto gastrointestinal, y también de temperatura en algunas áreas específicas o con padecimientos, debido a que el cuerpo humano responde ante estos cambios es así como los polímeros termosensibles buscan relacionarse con la temperatura crítica cerca al del cuerpo humano y con ello llegar a ser sistemas efectivos.^{31, 35}

III.2.4.1 Polímeros inteligentes sensibles a temperatura

Estos polímeros se dice que son sensibles a la temperatura ya que se ha observado que la variación de este parámetro provoca cambios estructurales interesantes, que permiten su aplicación en biomedicina.

En la mayoría de estos materiales existe un punto crítico en cual ocurre la temperatura de transición, una pequeña cantidad de polímeros responden a lo que se llama temperatura de transición de fase inversa o temperatura crítica inferior de solución (LCST), esto significa que el gel a temperaturas por debajo de su LCST se encuentran hinchados, mientras que si se aumenta la temperatura por arriba de esta el gel colapsa (Figura 6).

La variación de la LCST en un amplio rango permite la aplicación de este material no solo en el campo de los biomateriales sino también en sistemas de membranas, válvulas, y sensores.³⁶

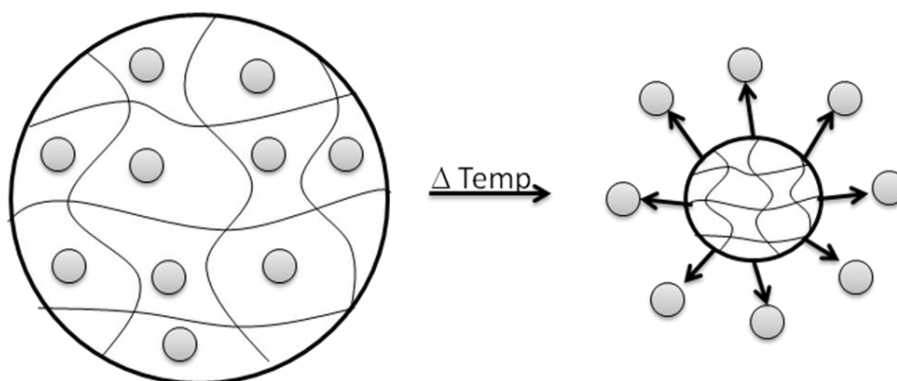


Figura 6. Representación esquemática del efecto térmico de un hidrogel que contiene fármaco.

Una característica interesante de muchos geles sensibles a estos estímulos es que el mecanismo que causa el cambio estructural es completamente reversible (Figura 7).³⁶

Los materiales inteligentes pueden clasificarse en función de su sensibilidad hacia un estímulo externo o clasificarse según la respuesta que manifiesten frente a un cierto estímulo, respuestas como, hinchamiento/contracción, flexión, cambio de color, cambio de estado, luminiscencia y conductividad.³⁸

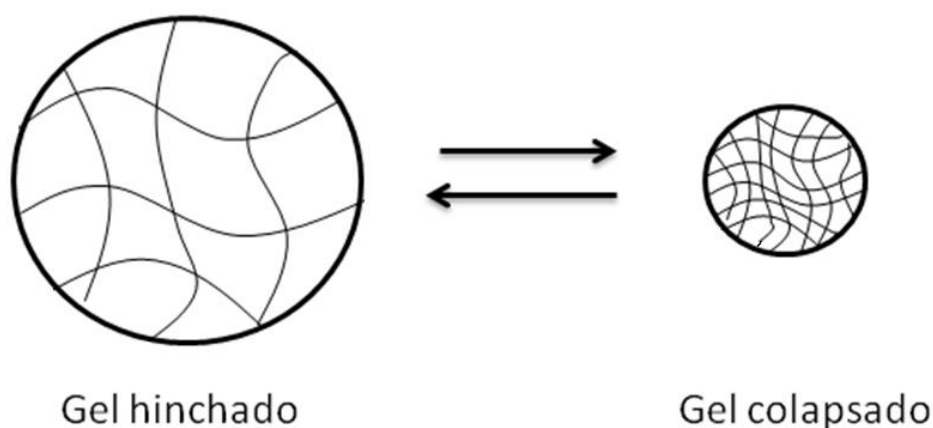


Figura 7. Representación esquemática del comportamiento reversible del gel (hinchamiento/colapso).

Los geles se han empleado como sistemas matrices para cultivo celular, biosensores, músculos artificiales, reemplazos de piel, ligamentos y cartílago, válvulas químicas superabsorbentes, liberación controlada de fármacos entre muchas otras aplicaciones.³⁹

Los hidrogeles sensibles a la temperatura son quizás la clase más estudiado de los sistemas de polímeros sensibles al medio ambiente en la administración de fármacos. En estos al menos un componente del sistema de polímero debe poseer una solubilidad

dependiente de la temperatura en un disolvente es decir, agua. Con el fin de obtener un hidrogel que cambia drásticamente su grado de hinchamiento en agua, los componentes de gel deben ser insolubles por encima o por debajo de una cierta temperatura.

Para aplicaciones de liberación de fármacos, se ha propuesto sistemas de liberación con cambios en la temperatura ya que el fenómeno que ocurre cuando se lleva a cabo la agregación de polímero se considera que es termodinámicamente similar a la temperatura cuando una proteína es inducida para lograr causar el plegado de esta.⁴⁰

III.3. GRADO DE HINCHAMIENTO (Q)

El grado de hinchamiento se define como la capacidad de penetración de las moléculas del disolvente en el polímero y este depende de su naturaleza, del grado de entrecruzamiento del polímero y de la naturaleza del disolvente, entre otros factores.⁴¹

Cuantificación del grado de hinchamiento.- Es la cantidad de líquido (agua, fluido biológico, disolvente orgánico) que logre atrapar el gel en su matriz polimérica y se calcula con la Ecuación 1⁴², donde W_h representa el peso del gel húmedo y W_s el peso del gel seco.

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_s}$$

Ecuación 1. Grado de hinchamiento

III.3.1. Factores que afectan al hinchamiento

Los parámetros que afectan el hinchamiento es la cantidad de entrecruzante, fuerzas intermoleculares como las de Van der Waals y puentes de hidrógeno, así como a interacciones iónicas e hidrofóbicas.³⁷ También interviene la fuerza iónica, debido a que las sales disueltas protegen a los grupos ionizados del gel, disminuyendo la ionización efectiva del polímero.⁴³

III.4. MICROPARTICULAS (MP)

La eficacia de las micropartículas puede aumentarse de forma significativa empleando como portadores micropartículas de polímeros hidrófilos reticulados. El grado de interacción, adhesión y asimilación de los fármacos a partir de micropartículas de diversos tamaños, parece incrementarse a medida que disminuye el tamaño de las partículas portadoras de los fármacos. El grado de interacción y asimilación del fármaco por el paciente puede aumentarse de forma notable mediante el empleo de micropartículas preparadas con hidrogeles "inteligentes", esto es, materiales sensibles a los cambios de pH o de temperatura.⁴⁴

III.5. N-ISOPROPILACRILAMIDA

III.5.1. NIPAAm

Históricamente, en las primeras publicaciones relacionadas con la *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) Figura 8, se puede observar la polimerización de este

monómero, el cual se ha empleado en muchas formas, las cuales incluyen cadenas sencillas, geles macroscópicos, microgeles, látex, películas delgadas, membranas, fibras, entre otras.

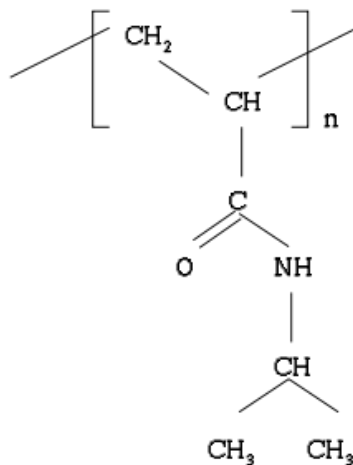


Figura 8. Poli (*N*-isopropilacrilamida)

III.5.2. GELES DE NIPAAm: materiales sensibles a la temperatura

Los geles son redes entrecruzadas de polímeros, hinchadas con un líquido Figura 9. Los principios de transición de fase y fenómeno crítico en geles poliméricos, son esenciales para el entendimiento de los geles y sistemas poliméricos en general. Estos fenómenos proporcionan una herramienta experimental con la cual se pueden explorar los fundamentos en las interacciones moleculares y reconocimientos en polímeros naturales y sintéticos. La transición de fase en un gel se comprueba con una manifestación macroscópica.

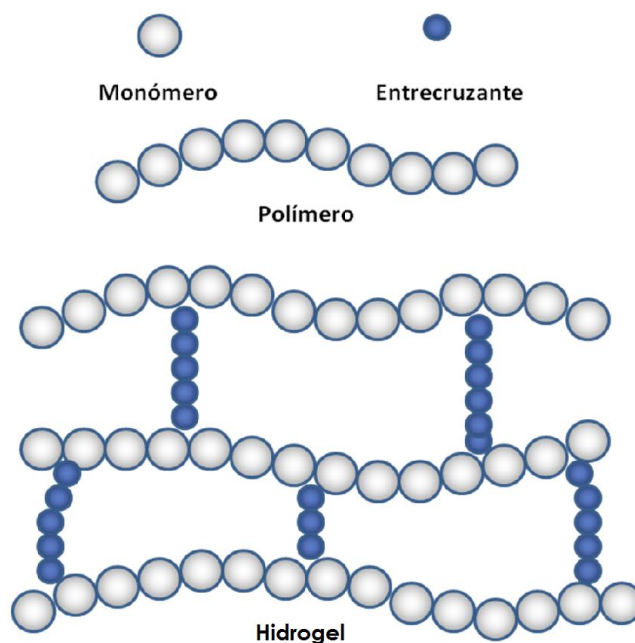


Figura 9. Representación de la formación de un gel

La capacidad para construir geles de NIPAAm de diversas geometrías ha llevado a un gran número de aplicaciones las cuales aprovechan el cambio en las dimensiones del gel para modular la difusión diferencial de especies en un medio. Esto amplía las condiciones para modular de manera selectivamente y con control de interruptor térmico.

Los cambios en los estados de hinchamiento o colapso de geles de NIPAAm, pueden influenciar la difusión de solutos desde el interior de los geles hacia el medio acuoso exterior. El hecho de que la LCST de los geles de NIPAAm puede ser ajustada cerca de la temperatura del cuerpo humano (37°C) por copolimerización y utilizando aditivos, hace que estos geles sean viables para aplicaciones *in vivo*.

Sin embargo, los hidrogeles convencionales para entrega de proteínas sufren ciertas limitaciones, por ejemplo la baja carga de fármacos y la dificultad de liberación completa de proteínas con altos pesos moleculares a partir de las redes del hidrogel. Por ello los esfuerzos se han dirigido a aumentar el nivel de carga del fármaco y las propiedades de liberación.¹⁵

Se han estudiado dos diferentes métodos para el cargado de macromoléculas los cuales pretenden el aumento en el cargado y liberación del fármaco, uno es permitir que el hidrogel se hinche en equilibrio en la solución de fármaco, esta técnica tiene defecto debido a que las proteínas son grandes y el nivel de carga es muy pequeño y una segunda es por el método de cargado in situ al momento de la mezcla con el monómero, en la cual se observa un aumento en el cargado pero una mínima liberación debido a que queda entre la red.

Con lo anterior es el principal interés en el ámbito científico el lograr superar estas problemáticas que presentan este tipo de sistemas, para con ello llegar a un sistema de liberación para macromoléculas adecuado, y con ellos ayudar a la mejora en la calidad de vida de los pacientes.

CAPÍTULO IV

EXPERIMENTAL

IV.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

a. Equipos

1. Agitador magnético VWR Dyla-Dual
2. Balanza analítica Denver Instrument M-200
3. Baño de temperatura, marca VWR International Shel Lab modelo 1217
4. Detector de luz dinámica (DLS) Equipo ZetaSizer Nano-ZS, Malvem Instruments, ZEN3500 con laser verde 532nm
5. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Beckman Coulter DU520, Single Cell module
6. Equipo de filtración con membrana milipore Superlco, Life Sciences GHP Acrodisc 25mm Syringe Filter 0.2µm, filtros Suport-100 0.2µm 47mm PN60310
7. Liofilizador Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 cyclos
8. Potenciómetro, 430 Corning.
9. Purificador de agua, Barnstead Sybron, modelo D2604
10. Recirculador de agua con temperatura controlada, Cole-Parmer Polystat modelo 12101-10 y una segunda marca LAUDA ecoline RE106

b. Reactivos, Disolventes y Gases

Todos los reactivos fueron de Aldrich Chemical Company, exepcto donde se indica lo contrario:

1. Acrilamida
2. Agua destilada (Harrowhead)

3. Albúmina de suero bovino (BSA)
4. Carbonato de sodio
5. Citocromo C
6. Cloruro de amonio
7. Diclorodimetilsilano
8. Etanol
9. Etilenglicoldimetacrilato (Acros Organics)
10. Fosfato de potasio monobásico
11. Fosfato dibásico de sodio
12. Isotiocianato de fluoresceína FITC
13. Hexano (Fermont)
14. *N*-isopropilacrilamida
15. *N,N'*-dimetilacrilamida
16. *N,N'*-Metilenbisacrilamida
17. Nitrógeno grado alta pureza (INFRA S.A. de C.V.)
18. Persulfato de amonio (APS)
19. Proteína verde fluorescente
20. Tetrametilendiamina
21. Tolueno
22. Vitamina B12

IV.2. PURIFICACIÓN DE *N*-Isopropilacrilamida

El monómero de NIPAAm se adquiere de manera comercial con un inhibidor de polimerización, por lo cual es necesario realizar un proceso de purificación para removerlo, el monómero de NIPAAm se purificó con hexano (25 g NIPAAm/200 mL hexano). Se coloca el hexano en un matraz erlenmeyer y se calienta hasta 45°C utilizando un baño de agua, se agrega la NIPAAm y se mantiene en agitación constante hasta homogeneizar, se filtra en caliente y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez cristalizado el contenido se filtró a vacío, realizando lavados con hexano frío obteniendo la NIPAAm purificada.

IV.3. SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS CON NIPAAm Y COPOLIMEROS

La síntesis de micropartículas se llevó a cabo en solución, las cuales se prepararon en las proporciones mostradas en la Tabla 1. Los diferentes monómeros de NIPAAm, Acrilamida (AAm) y Dimetilacrilamida (DMA) se disuelven en agua en las proporciones descritas, utilizando Etilenglicol dimetacrilato (EDGMA) 5% molar como agente entrecruzante, manteniendo esta mezcla en agitación constante, con burbujeo de nitrógeno por 30 min para la eliminación del oxígeno en la solución, posteriormente las soluciones se llevaron a baño de aceite hasta alcanzar la estabilidad a temperatura de 80°C. una vez alcanzada la temperatura se adicionó el iniciador de la polimerización persulfato de amonio (APS) al 2% w/w y se mantiene a 80°C por 45 minutos, finalmente se retira y se coloca en un baño de hielo para detener la reacción.

Tabla 1. Tabla de concentraciones de monómeros en las micropartículas

Micropartículas	NIPAAm (%)	AAm (%)	DMA (%)
NIPAAm	100	0	0
NIPAAm/AAm (10%)	90	10	0
NIPAAm/AAm (15%)	85	15	0
NIPAAm/AAm (20%)	80	20	0
NIPAAm/DMA (10%)	90	0	10
NIPAAm/DMA (20%)	80	0	20
NIPAAm/DMA (30%)	70	0	30

La solución fue purificada por diálisis contra agua destilada usando una membrana de corte molecular de 12,000 a 14,000 g/mol y posteriormente se liofilizo. Estas micropartículas obtenidas se analizan a través del Zetazizer para conocer su tamaño y temperatura de transición.

IV.4 PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON MP CON MOLÉCULAS IN SITU

IV.4.1. Hidrogeles con MP con GFP in situ

Se prepararon hidrogeles con micropartículas de NIPAAm los cuales contienen proteína verde fluorescente (GFP), empleando polimerización vía radicales libres, este método inicia colocando en un matraz bola NIPAAm, BIS, MP de NIPAAm y GFP, estos se mantiene con agitación constante por 15 min, transcurrido el tiempo es agregada la

solución iniciadora de APS (0.15 M) durante un minuto de agitación, posteriormente agregar TEMED (0.15 M) un minuto y la solución resultante se coloca en moldes de vidrio.

Los moldes consisten en dos placas de vidrio de 10 x 10 previamente silinizadas por inmersión en una disolución 2% v/v de diclorodimetilsilano en tolueno durante cinco minutos, se enjuagaron con tolueno y fueron secadas a temperatura ambiente.

Por otro lado se emplea un espaciador de hule de silicona de un milímetro de diámetro, entre las dos placas de vidrio ensambladas con pinzas de metal. El método de vaciado es por medio de una jeringa, con la cual se colocó la disolución entre las dos placas de vidrio y el molde se posicionó verticalmente y se dejó en reposo bajo temperatura de 4°C por 24 horas para concluir con la polimerización (Figura 10).

Concluido ese tiempo, se extrajo la lámina de gel y se colocó en un recipiente con agua para lograr su purificación, eliminando cualquier resto de material, esto se realiza una vez al día por 7 días.

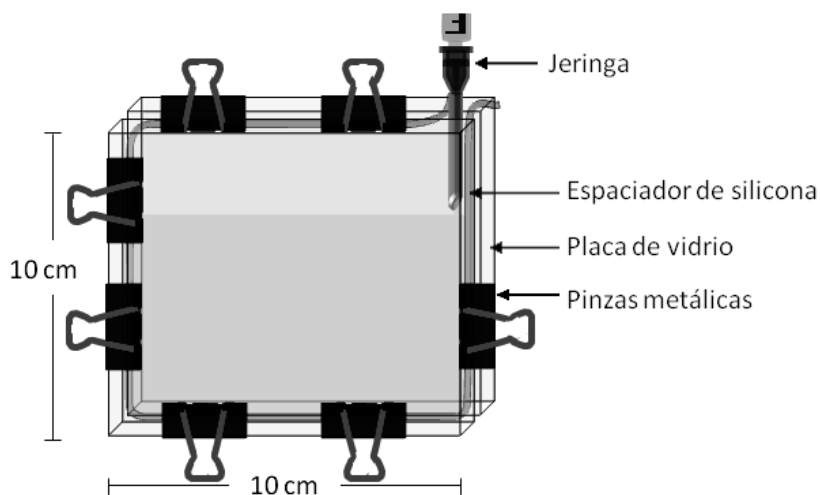


Figura 10. Representación esquemática de la preparación de geles entre placas de vidrio.

Una vez purificado el gel se procede al corte de los discos por medio de un perforador de un cm de diámetro, una vez obtenido cada disco de gel se pesa para calcular el porcentaje de cargado.

IV.4.1.1. Liberación de hidrogeles con GFP

El proceso de liberación de GFP se llevo a cabo por dos diferentes procedimientos, el primero se desarrolla en un recirculador a temperatura de 25°C y agitación constante, en un vial se coloca el gel, 1.5ml de buffer de fosfatos pH 7.4, en el cual se toman alícuotas de 1 ml cada hora siendo remplazado, durante las primeras 10 horas y concluyendo con un muestreo a las 24 y 48 horas.

Estas alícuotas son procesadas midiendo su absorbancia a dos longitudes de onda, la primera donde la proteína GFP presenta absorbancia máxima a 474nm⁴⁵ y la segunda lectura a 280nm, región en la cual absorben los animinoacidos que conforman las proteínas.⁴⁶

El segundo estudio de liberación involucra un cambio en los ciclos de temperatura siendo estos de 25°C a 42°C, realizando el mismo proceso anteriormente descrito, iniciando este estudio en 25°C durante dos horas y posteriormente a 42°C por una hora, tomando alícuotas cada hora durante todo el proceso, repetir el ciclo hasta completar 7 horas.

Estas alícuotas se procesan de la misma manera que el primer procedimiento y se analizan los datos de absorbancia obtenida.

IV.4.2. Hidrogeles con MP con Cit C in situ

Se prepararon hidrogeles con MP de NIPAAm con Citocromo C (Cit C), siguiendo el mismo método antes mencionado en el capítulo IV. 4.1, en este caso se varia la concentración de Cit C siendo 1mg/ml y 10mg/ml que es agregado en la formación del gel antes descrita.

Continuando con el corte de los hidrogeles y calculando su porcentaje de citocromo C incorporado a través del peso del mismo.

IV.4.2.1 Liberación de hidrogeles con Cit C in situ

El proceso de liberación de Cit C se lleva a cabo mediante el mismo proceso que GFP por los dos diferentes procedimientos, las alícuotas obtenidas son analizadas a 528nm.

El segundo estudio de liberación es realizado en ciclos de temperatura de 25°C a 42°C por 1 hora en cada temperatura y tomando alícuotas en cada una, llevando este cambio por 8 horas de muestreo y una última a las 24 horas. Estas alícuotas se analizan y se procesan los datos en base a las absorbancias obtenidas.

IV.5 PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON AJUSTE DE TEMPERATURA

Se prepararon hidrogeles con diferentes monómeros se realiza para lograr un ajuste en la temperatura de los mismos, esto a partir de NIPAAm y copolimerizando con acrilamida y dimetilacrilamida mediante polimerización en disolución vía radicales libres,

la reacción se muestra en la Figura 11. Estos fueron elaborados en forma de lámina delgada entre dos placas de vidrio con un espaciador de silicona de 1mm.

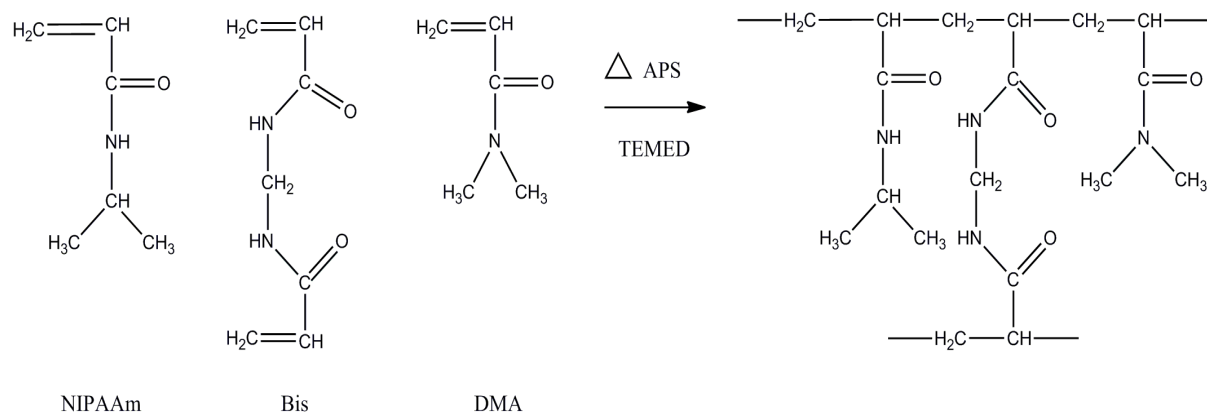


Figura 11.- Representación grafica de la conformación de los hidrogel con ajuste de temperatura.

En la tabla 2 se muestra la relación de los porcentajes con los que se llevo a acabó para la realización de los hidrogeles.

Tabla 2.- hidrogeles de NIPAAm y copolímeros sus en sus diferentes combinaciones.

Hidrogel	NIPAAm (%)	Acrilamida (%)	Dimetilacrilamida (%)
NIPAAm	100	0	0
NIPAAm/AAm(10%)	90	10	0
NIPAAm/AAm(20%)	80	20	0
NIPAAm/DMA(10%)	90	0	10
NIPAAm/DMA(20%)	80	0	20

Se utilizaron las diferentes proporciones mostradas anteriormente en las cuales se adicionó como medio de disolución agua destilada, la *N-N*-metilenbisacrilamida (BIS) actúa como agente entrecruzante, y es utilizado sin purificación. Una disolución acuosa 0.15 M de APS como iniciador y como catalizador de la reacción TEMED en disolución al 0.15 M.

IV.6. ESTUDIO DEL HINCHAMIENTO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA

Este estudio se realizó con el propósito de observar el comportamiento de los diferentes hidrogeles ante el cambio de temperatura y con lo cual se determinará la temperatura crítica de transición, en base a su peso.

El estudio se inicia pesando cada uno de los diferentes hidrogeles y se registra su peso en seco. Posteriormente se colocan en diferentes viales con 5 ml de agua destilada cada uno, en el baño de agua anteriormente encendido a una temperatura inicial de 50°C.

Una vez que trascurrió el tiempo necesario donde el hidrogel llega a hincharse hasta su punto de equilibrio, se comenzó a descender la temperatura paulatinamente cada 2°C hasta llegar a 20°C, respetando el tiempo de equilibrio y procediendo a tomar el peso de cada gel en cada intervalo de temperatura.

IV.7. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO

La finalidad de este estudio es conocer los cambios en el grado de hinchamiento de los diferentes geles con respecto al tiempo.

Primero se obtuvo el peso de cada uno de los geles secos esto por duplicado. Se colocó un disco del gel a la vez, en un vial con 10ml de agua destilada a 25°C con agitación constante. Una vez iniciado este proceso se procedió a pesar el gel a diferentes tiempos 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 y 1440 minutos.

Se debe ser muy cuidadoso al momento de extraer los geles para ser pesados, este procedimiento se realiza lo más rápido posible, eliminando el agua excedente de cada gel antes de ser pesado.

Con los datos adquiridos se calculó gravimétricamente el grado de hinchamiento, en base al agua absorbida, comparando el peso del gel hinchado y seco, conforme la Ecuación 1.

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_s}$$

IV.8. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE COLAPSO

Este se realiza por duplicado pesando el gel en seco para poder determinar la cinética de colapso, se procedió al hinchamiento de los geles hasta su equilibrio a 25°C por 48hr y posteriormente se colocaron en los viales con 10 ml de agua destilada a 42°C, este estudio también inicia en 37°C y se colapsa a 42°C para así lograr obtener los distintos parámetros de colapso, con agitación constante, una vez colocados se pesaron a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 minutos, con los pesos obtenidos en los diferentes tiempos se analizo utilizando la Ecuación 1, mostrándonos la cinética de colapso de estos geles.

IV.9. PREPARACIÓN DE HIDROGELES DE NIPAAm/DMA(20%) CON DIFERENTES % DE MICROPARTÍCULAS

Se prepararon diferentes hidrogeles a partir de NIPAAm/DMA(20%) al cual se incorporaran diferentes porcentajes de las distintas micropartículas, observándose en la tabla 3, utilizando BIS como entrecruzante al 3%.

Tabla 3. Porcentajes en el gel de NIPAAm/DMA(20%) con diferentes micropartículas.

Micropartículas (n/ml)	NIPAAm (%)	NIPAAm/AAm(15%) (%)	NIPAAm/AAm(20%) (%)
15% NIPAAm	15	0	0
15% NIPAAm/AAm(15%)	0	15	0
15% NIPAAm/AAm(20%)	0	0	15
30% NIPAAm/AAm(15%)	0	30	0
30% NIPAAm/AAm(20%)	0	0	30

En todos los casos se utilizó 1% APS, 1% TEMED en base a los moles del monómero y copolímero según sea el caso, variando los porcentajes y tipo de micropartículas.

El método de preparación del los diferentes hidrogeles se realizan de la misma manera, por lo cual se explicara el procedimiento en general.

El primer paso de este proceso es colocar los moldes de placa de vidrio en un baño de hielo para mejorar el proceso de polimerización, una vez hechos los cálculos necesarios se coloca en un matraz bola los g de NIPAAm, DMA, BIS, en agua destilada, todo esto se mantiene en agitación constante por 15 minutos, las micropartículas se agregan junto con los materiales antes mencionados. Una vez transcurrido este tiempo se coloca la solución

de APS durante 1 minuto continuando con la agitación, y por último se agrega la solución de TEMED se mantiene por 1 minuto más, para con esto concluir la preparación procediendo de inmediato en la colocación de la solución en el molde e placas de vidrio que se encontraba en baño de hielo.

Se colocan a 4°C por 24 horas, una vez transcurrido el tiempo se procede a cortar el gel en pequeños discos de 1cm de diámetro con un orador (Figura 12).



Figura 12. Viales que contienen los discos de cada diferente gel.

IV.10. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO/COLAPSO

Estos se realizan en dos cambios de temperaturas el primero de 25°C y 42°C por debajo y arriba de la temperatura de transición reportada del polímero de NIPAAm y de 37°C y 42°C en los cuales se consideran por abajo y arriba de la temperatura de transición de las micropartículas utilizadas. Los geles se pesaron en seco y se colocan 24 horas en agua destilada a temperatura ambiente para lograr que se encuentre en equilibrio, este estudio se realiza en dos recirculadores de agua con temperatura controlada estos con

agitación constante. Se procede a colocar el gel en el vaso a 42°C durante una hora sacando el gel cada 15 minutos para que sea pesado, después se repite el proceso en el vaso con temperatura de 25°C o en su caso el de 37°C, este proceso se repite durante 7 horas que dura el muestreo, intercambiando cada hora en las diferentes temperaturas. Una vez terminados los experimentos se procedió a calcular el grado de hinchamiento de cada uno de los geles, lo cual nos muestra la cinética de hinchamiento y el colapso del gel y si su comportamiento es reproducible.

IV.11. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron por duplicado, utilizando Vitamina B12, Citocromo C, albúmina marcada con fluoresceína. Los dos primeros fueron elegidos por su bajo peso molecular y son coloridos, la albúmina para observar el comportamiento de los hidrogeles ante una proteína de alto peso molecular facilitando su cuantificación por su color por espectrofotometría UV/Vis. La cinética de liberación se efectuó en disoluciones amortiguadora de fosfatos a pH 7.4.

IV.11.1. Liberación de Vit B12

IV.11.1.1. Cargado de geles con Vitamina B12

El método de cargado con el cual se incorporó la Vitamina B12, se inició pesando cada gel y colocándolo en 3 ml de una solución de vitamina B12 la cual contenía 10mg/ml, estos son colocados en el refrigerador a 4°C por un periodo de 7 días para asegurar que se ha hinchado y atrapado la máxima cantidad de la misma.

IV.11.1.2. Estudios de liberación de Vitamina B12

Previo a los estudios de liberación, se estableció una curva de calibración para la Vit B12 (Anexo 1). Ésta se obtuvo mediante espectrofotometría UV-Vis, cuyas lecturas se efectuaron a una $\lambda=361$ nm.

La disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7.4 se preparó de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8^{va} Edición.

La metodología para los experimentos de liberación fue la siguiente: en un vial se colocaron 3 ml de buffer en agitación constante en un recirculador de agua con temperatura controlada de 25°C y 42°C o de 37°C y 42°C Figura 13.

Acto seguido, se dispuso un disco a la vez en la solución que contenía 3ml de amortiguador, este se colocó primero a 25°C, se tomaron alícuotas de 1 ml cada 15 minutos, poniendo atención en reponer el volumen extraído, una vez transcurrida la hora se extraía el gel, se colocaba en el vial siguiente este con temperatura de 42°C y se continúa con la extracción de alícuota de 1 ml y reposición del volumen, esto se repite por 7 horas hasta lograr los 3 ½ ciclos, una vez terminados estos ciclos se deja el gel hasta que sean las 24 horas y se toma una última alícuota.

Posterior mente se realiza el estudio de 37°C a 42°C realizando el mismo procedimiento anteriormente descrito, solamente mostrando su diferencia en la temperatura inicial.

Una vez terminado se procede a la lectura de las muestras tomadas en el espectrofotómetro Uv-Vis a $\lambda=361$ nm. Esto se realiza un gel a la vez y por duplicado, se procedió a su comparación.

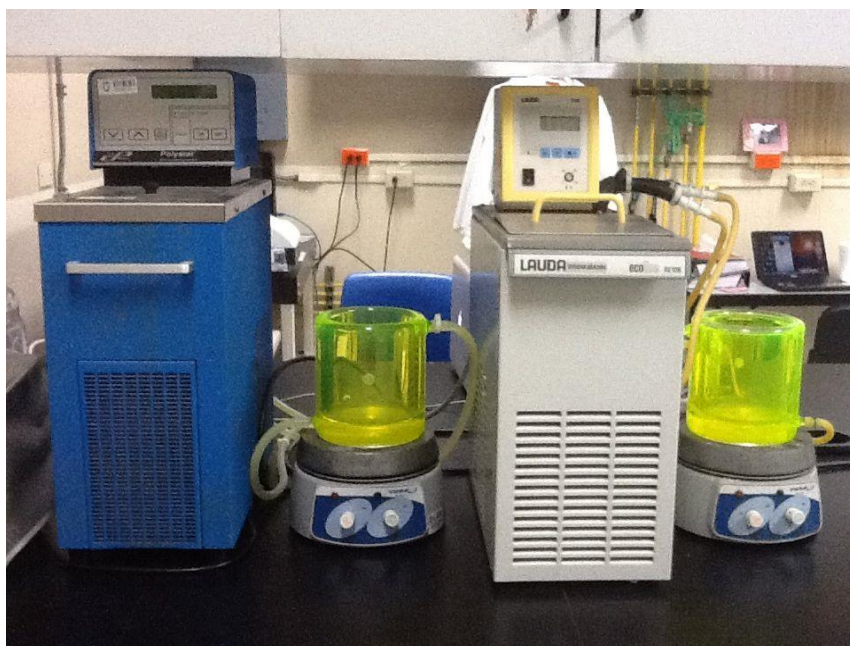


Figura 13. Sistema empleado para los estudios de liberación.

IV.11.2 Liberación de Citocromo C

IV.11.2.1. Cargado de geles con Citocromo C

El método de cargado se realizó siguiendo la misma metodología que con Vit B12, se inicia pesando cada gel y colocándolo en una solución de Cit C la cual contenía 1mg/ml, estos son colocados en el refrigerador a 4°C por un periodo de 7 días.

IV.11.2.2. Estudios de liberación de Citocromo C

Previo a los estudios de liberación, se estableció una curva de calibración para el Cit C (Anexo 2). Esta se obtuvo mediante espectrofotometría UV-Vis a una $\lambda=528\text{nm}$. La metodología para los experimentos de liberación se realizó de la misma manera que la liberación de Vitamina B12, se tomaron el mismo número de alícuotas. Esto se realizó un gel a la vez y por duplicados y fueron comparados.

IV.11.3. Liberación de Albúmina marcada con fluoresceína

IV.11.3.1. Marcaje de Albúmina con fluoresceína

El método de marcaje de albúmina (BSA) inicia colocándose 2ml de BSA 0.25 mM, un ml de isotiocianato de fluoresceína (FITC) 5 mM, en un tubo cónico y se añaden a 10ml con agua destilada protegido de la luz, se mantiene por 8 horas a 4°C, una vez transcurrido el tiempo se agregan 5ml de NH_4Cl 200mM y se continúa a 4°C por 2 horas más.

Transcurrido este proceso se procede a la purificación de la misma, esto es en una columna PD-10, en la cual se coloca 2.5ml de la solución obtenida y se corre con buffer de fosfatos pH 7.4, colectado la albúmina marcada con fluoresceína y desechando la fluoresceína no unida.

La determinación de la concentración de la albúmina marcada es por medio de espectroscopia de UV-Vis a una $\lambda=280$, en la cual la absorbancia debe encontrarse de 0.1 a 0.5, aplicando la ley de Lambert-Beer Ecuación 2.

$$C = \frac{A_{280}}{\epsilon}$$

Ecuación 2.- Ecuación de Ley de Lambert – Beer

Donde se representa la concentración a determinar (C), absorbancia obtenida a $\lambda=280\text{nm}$ (A_{280}), y el coeficiente molar de extinción es (ϵ).

IV.11.3.2. Cargado de geles con Albúmina marcada con fluoresceína

La metodología para los experimentos de liberación se maneja diferente a los anteriores, en este se colocó en un vial un ml de albúmina marcada por 24 horas a 32°C en un recirculador, la albúmina contenida en estos geles son de dos diferentes concentraciones 6.5mg/ml y 30mg/ml, una vez transcurrido su tiempo de cargado se coloca en seco y a temperatura ambiente para que estos se sequen por completo y así se encuentren listos para su liberación.

IV.11.3.3. Estudios de liberación de Albúmina marcada con fluoresceína

Previo a los estudios de liberación, se estableció que a través de la ecuación 2 se calculará la concentración de albúmina marcada, midiendo su absorbancia a UV-VIS 280nm. La metodología para los experimentos de liberación se realizó colocando un vial con un ml de buffer de fosfatos pH 7.4 en el cual se colocó en el gel a 37°C, comenzó el muestreo tomando una alícuota de un ml cada 15 min reponiendo el líquido, durante una hora, las horas posteriores se muestreo una vez cada hora por 7 horas y tomando una muestra a las 24h. Las alícuotas obtenidas son leídas a $\lambda=280\text{nm}$.

Los hidrogeles también son estudiados en ciclos de temperatura, de 25°C a 42°C y otra corrida de 37°C a 42°C, los cuales siguieron el mismo procedimiento antes mencionada para la liberación solamente cambiando los viales a las temperaturas designadas.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS

Se obtuvieron micropartículas de NIPAAm con los diferentes copolímeros en diferentes porcentajes, las cuales fueron estudiadas por medio de dispersión de luz dinámica, en el equipo Zetasizer. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de los cuales se eligieron tres micropartículas con las condiciones adecuadas.

Tabla 4.- Tamaños de partícula (nm), índice de polidispersidad (PDI) y temperatura de transición (Ttr)

Rxn	Tamaño	PDI	LCST (°C)
MP-003 NIPAAm	579	0.078	32
NIPAAm/DMA (10%)	497	0.111	34
NIPAAm/DMA (20%)	363	0.085	34
NIPAAm/DMA (30%)	360	0.013	36
NIPAAm/AAm (10%)	610	0.172	38
NIPAAm/AAm (15%)	1023	0.386	38
NIPAAm/AAm (20%)	804	0.543	40

Las micropartículas fueron elegidas ya que cumplen con ajuste de temperatura por arriba de la temperatura corporal así mismo con un tamaño lo suficiente mente grande para llegar a lograr el mayor tamaño en el poro posible y a su vez mantener las micropartículas de NIPAAm como blanco para comparaciones, Figura 14, nos muestra la transición de cada micropartícula elegida para continuar en el estudio.

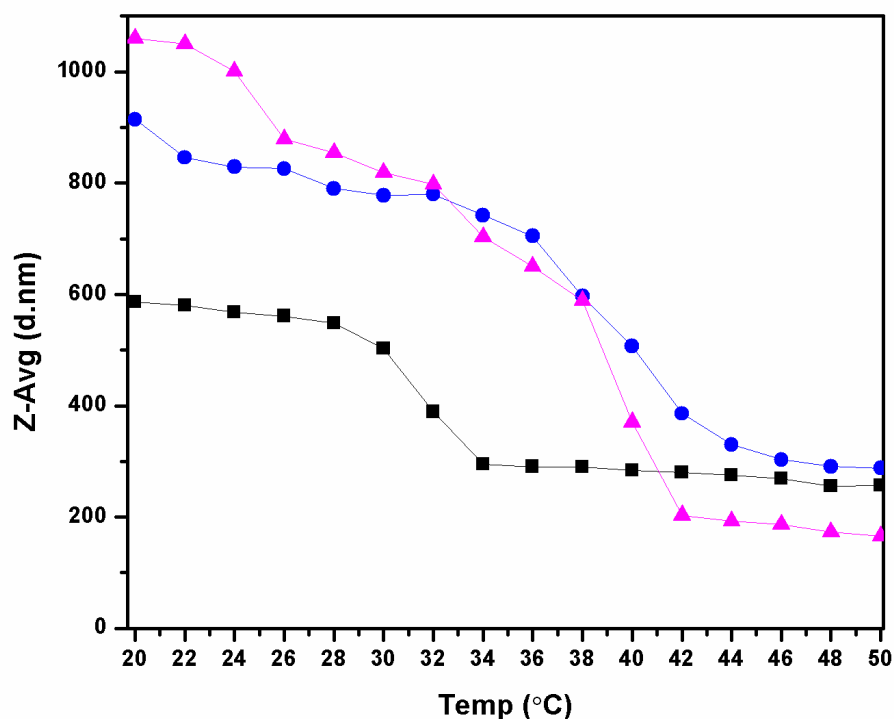


Figura 14.- Temperatura de transición de micropartículas NIPAAm (—■—), NIPAAm/AAm (15%) (—▲—), NIPAAm/AAm (20%) (—●—).

V.2 PREPARACIÓN DE GELES CON MP CARGADO CON MOLECULAS IN SITU

V.2.1. Hidrogeles con MP de NIPAAm con GFP

Se prepararon hidrogeles a partir del monómero *N*-Isopropilacrilamida con 15%MP de NIPAAm, en el cual se cargaron satisfactoriamente GFP en el cual se utilizó *N*-*N*-metilenbisacrilamida como agente entrecruzante, los cuales muestran en la figura 15, esto mediante el método de polimerización vía radicales libres.



Figura 15.- Hidrogeles de NIPAAm con MP de NIPAAm y cargados con GFP IN SITU.

Se elaboró una placa de hidrogel de NIPAAm con 15%MP NIPAAm con proteína verde fluorescente del cual se obtuvieron 7 geles cargados para su estudio, con una apariencia transparente y una tonalidad de verde fluorescente. Estos geles fueron pesados para conocer el estado de cargado de cada disco. En la Tabla 5 se muestra los resultados del peso y el % de cargado de cada uno.

Tabla 5. Peso y contenido de GFP en cada hidrogel.

Concentración de GFP de cada gel				
Gel	W (g)	%	[g]	[mg]
1	0.1202	6.70	0.00007	0.074
2	0.1040	5.80	0.00006	0.064
3	0.0966	5.39	0.00006	0.059
4	0.1069	5.96	0.00007	0.066
5	0.1059	5.91	0.00006	0.065
6	0.1018	5.68	0.00006	0.062
7	0.0988	5.51	0.00006	0.061
Resto	1.0589	59.05	0.00065	0.650

V.2.1.1 Liberación hidrogeles con GFP *In situ*

Para realizar el estudio de estas liberaciones lo primero fue realizar una curva de calibración de la sustancia que será liberada, en este caso Proteína verde fluorescente que tiene un peso molecular de 27 kDa.

V.2.1.2 Evaluación de la cinética de liberación de GFP

La cinética de liberación se llevó a cabo de manera *in vitro* todos los datos obtenidos se transformaron mediante el cálculo usando la Ecuación 3, donde F_t es la fracción liberada, M_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t y M_∞ es la cantidad total de fármaco en el gel.

$$F_t = \frac{M_t}{M_\infty}$$

Ecuación 3. Fracción de fármaco liberado

La liberación se realizó de la manera antes descrita a través de los recirculadores dando como resultado una nula liberación en ambos, mostrando que el hidrogel permanece con la coloración verde a través del tiempo.

V.2.2. hidrogeles con MP de NIPAAm con Citocromo C *In situ*

Se prepararon hidrogeles a partir del monómero NIPAAm con 15%, en el cual se cargaron dos concentraciones diferentes de Cit C siendo de 1mg/ml y 10mg/ml en el cual se utilizó *N-N*-metilenbisacrilamida como agente entrecruzante, los cuales muestran en la Figura 16.



Figura 16.- A) hidrogel con 1mg/ml de Cit C y B) hidrogel con 10mg/ml de Cit C.

Se elaboró una placa de gel de 1mg/ml de Cit C de la cual se obtuvieron 3 hidrogeles cargados, mostrando los resultados obtenidos en la Tabla 6, mientras que del gel de concentración de 10 mg/ml se obtuvieron 3 hidrogeles mostrados en la Tabla 7.

Tabla 6. Porcentaje y miligramo de Cit C en hidrogel cargado con 1mg/ml de Cit C.

Cargado de hidrogeles 1mg/ML		
Gel	%	[mg] Cit C
1	7.3	0.073
2	5.68	0.056
3	6.25	0.062

Tabla 7. Porcentaje y miligramos de Cit C en hidrogel, cargado con 10mg/mL de Cit C.

Cargado de hidrogeles 10mg/mL		
Gel	%	[mg] Cit C
1	8.08	0.8
2	7.67	0.76
3	8.57	0.85

V.2.2.1. Liberación hidrogeles con MP de NIPAAm con Citocromo C *In situ*

Para iniciar con el estudio de la liberación de los hidrogeles es necesario realizar una curva de calibración de Citocromo C, la cual es una molécula que cuenta con un peso molecular de 12 kDa, y su lectura se realiza a los 528nm.

V.2.2.2. Evaluación de la liberación hidrogeles con MP de NIPAAm con Cit. C *In situ*

La cinética de liberación se llevó a cabo de manera *in vitro*, de forma similar al hidrogel con GFP.

El hidrogel de NIPAAm con Cit C en concentración de 1mg/mL cargado vía IN SITU, es estudiado mediante la liberación a 25°C, donde el hidrogel en un vial el cual contenía 1 ml de buffer de fosfatos pH 7.4, mostrando en la Figura 17 el comportamiento de este donde el cargado inicial se muestra muy bajo siendo de 0.06mg, y muestra una liberación relativamente rápida ya que nos indica que la fracción liberada en 3 horas alcanza un 0.6 del contenido, y llegando a un máximo pico de 0.8 del contenido, sin embargo el hidrogel no logra alcanzar a liberar el total del contenido después de 48 horas y este muestra una tonalidad rojiza lo que nos indica que todavía se encuentra contenido moléculas de citocromo C en su interior el cual no logra ser liberarlo.

Lo anterior nos indica que el citocromo C puede estar interactuando al momento de llevar a cabo la polimerización dando como resultado que las moléculas queden en los entrecruzamientos y esto evite que sea liberado el total de lo cargado.

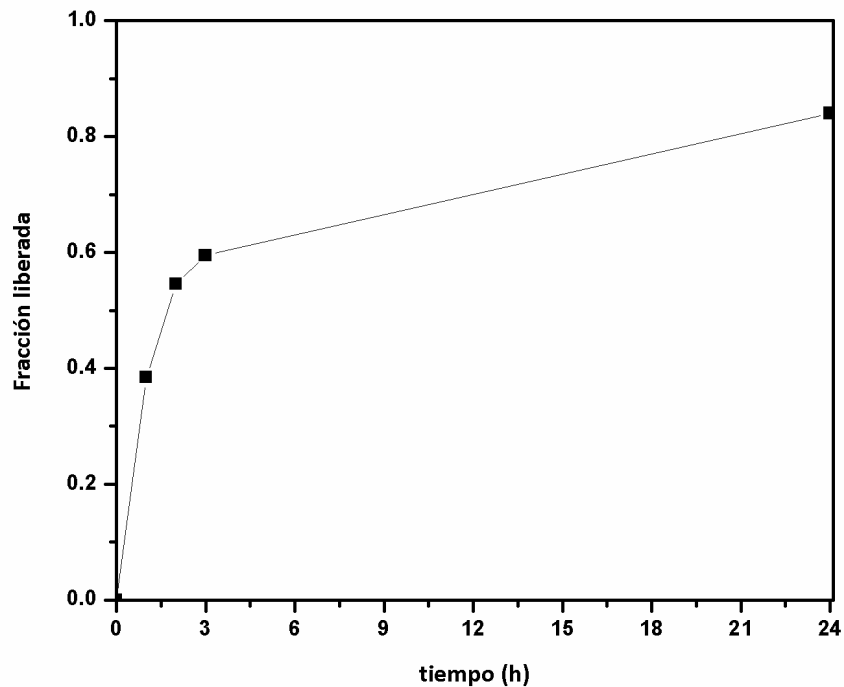


Figura 17.- Gráfica de liberación a 25°C del hidrogel de NIPAAm con 15% MP de NIPAAm con Citocromo C de 1mg/mL de manera IN SITU

Segunda etapa el hidrogel de NIPAAm con 15%MP NIPAAm es cargado en una solución de 10mg/ml, este procedimiento se realizo su liberación de la misma manera que el gel de 1mg/ml, donde se muestran los resultados en la Figura 18 de la liberación de Citocromo C a 25°C.

En la Figura 18 podemos observar la liberación realizada a 25°C en el cual contiene un total de alrededor de 0.8mg de Cit C, mostrando el comportamiento de este hidrogel en el cual se observa un patrón de una liberación controlada, en el cual inicia liberando 0.2 de fracción libre en la primera hora y continua librando aunque disminuye su capacidad de liberar, logrando cerca de 0.6 a las 7 horas mostrando una baja liberación, confirmando

con una última muestra a las 24 horas mostrando una fracción liberada de tan solo el 0.62 del cargado.

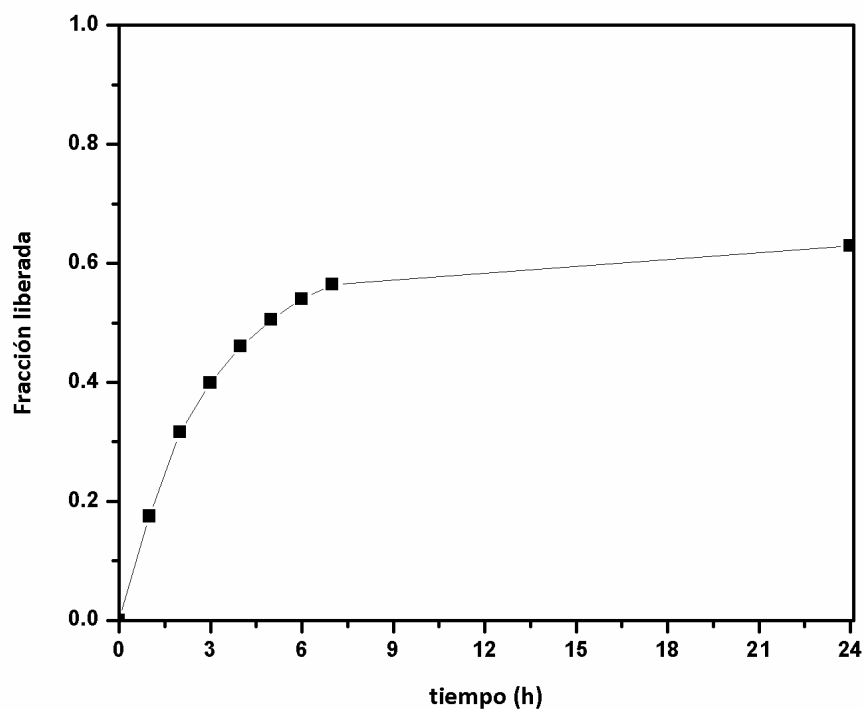


Figura 18.- Grafica de liberación a 25°C del hidrogel de NIPAAm con 15% MP de NIPAAm con Citocromo C de 10mg/mL de manera IN SITU

Una vez concluida su liberación del hidrogel se observó que permaneció con una coloración rojiza lo que nos indica que un porcentaje del cargado de Citocromo C permanece atrapado en la estructura del hidrogel.

Lo anterior nos lleva al estudio del hidrogel con una liberación en ciclos de temperatura el cual se muestra en la Figura 19, donde se observa dos cambios de temperatura 25°C a 42°C.

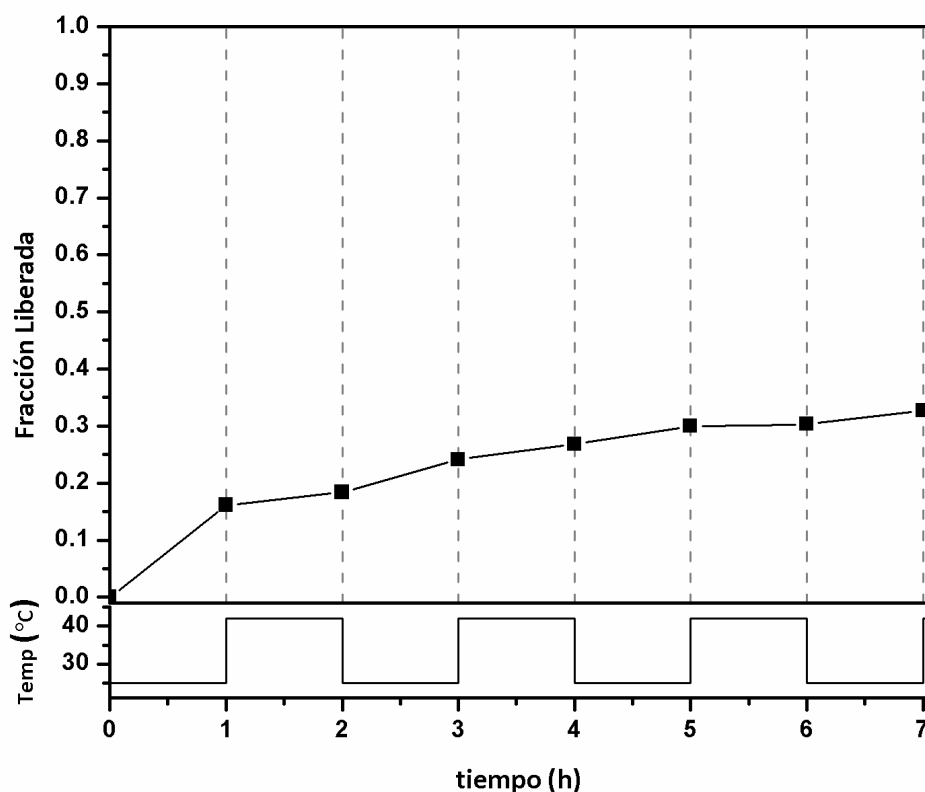


Figura 19.- Gráfica de liberación del hidrogel NIPAAm con 15%MP NIPAAm con Cit C 10mg/mL In situ con variación de temperatura de 25°C a 42°C.

En esta estudio se observa el comportamiento del hidrogel cargado el cual contiene 0.8 mg de Citocromo C, durante su liberación es intercalado en cambios de temperatura de 25°C y 42°C, los resultados nos muestran una baja liberación siendo ligeramente mayores a 25°C mientras tanto a altas temperaturas de 42°C se observa una liberación disminuida al mínimo al momento de la contracción del hidrogel. A las 7 horas de muestreo la liberación del mismo se mantiene baja llegando solamente a 0.36 de la fracción cargada, la alícuota tomada a las 24 horas nos muestra una liberación de 0.38.

Estos resultados obtenidos a través de las diferentes liberaciones nos dan un indicio de que las macromoléculas que se cargaron están siendo atrapadas al momento de ser polimerizado el hidrogel. Con este comportamiento se llegó a la conclusión que al ser macromoléculas al momento de polimerizar el hidrogel con las macromoléculas como parte de la formulación, en un gran porcentaje de estas están quedando entrecruzadas en el hidrogel formando parte de la red tridimensional de este y con esto evitando que sea posible la liberación el total del contenido en la polimerización IN SITU.

V.3. PREPARACIÓN DE HIDROGELES CON AJUSTE DE TEMPERATURA

Se sintetizaron 5 tipos de hidrogeles de los cuales el primero contiene solamente NIPAAm el cual se utilizará como blanco para comparar los cambios en comparación con los hidrogeles copolimerizados. Se sintetizaron 4 tipos de hidrogeles con copolímeros de acrilamida y *N,N*-dimetilacrilamida, con lo cuales se propusieron dos proporciones siendo estas de 90:10 y 80:20 con ambos copolímeros dando en total 4 hidrogeles con ajuste de temperatura.

V.3.1 Estudio del hinchamiento con respecto a la temperatura

Este análisis se emplea para conocer el comportamiento de los geles conforme aumenta la temperatura del medio, para con ello poder determinar la temperatura crítica de transición, este por medio se observa cuando ocurre un cambio drástico en el gel que pasa de estar hinchado a colapsarse de forma drástica, como se puede observar en la Figura 20.

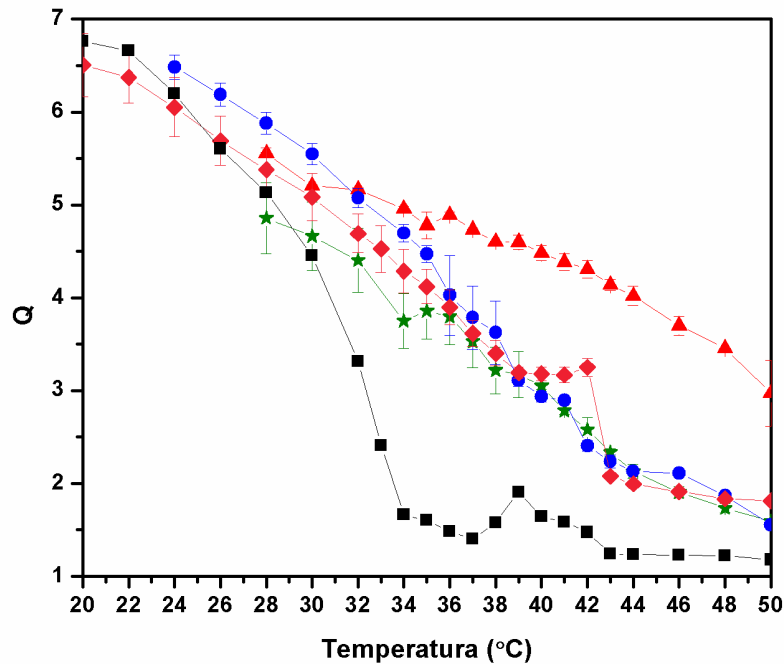


Figura 20.- Gráfica del grado de hinchamiento de geles de NIPAAm copolimerizados, NIPAAm (—■—), NIPAAm/AAm (10%) (—★—), NIPAAm/AAm (20%) (—▲—), NIPAAm/DMA (10%) (—●—), NIPAAm/DMA (20%) (—◆—) a diferentes temperaturas.

En la Figura anterior se observa el comportamiento muy marcado de la NIPAAm en el cual el cambio se presenta a 32°C siendo característico de la misma, los hidrogeles de AAm de 10% y 20% muestran un comportamiento secuencial sin mostrar un cambio discontinuo que nos muestre una temperatura de transición, lo que significa que este copolímero ajusta la temperatura de transición sin llegar a ser drástica, mientras tanto el hidrogel con DMA 10% muestra una tendencia marcada pero continua sin mostrar un cambio brusco ante la temperatura, sin embargo el hidrogel de con DMA 20%, se observa una discontinuidad ligera pero significativa a

temperatura de 42°C con el cual nos da la pauta para continuar los estudios de este copolímero para determinar sus propiedades.

V.3.2. Estudio del grado de hinchamiento

Todos los experimentos realizados tienen como único o principal cálculo el grado de hinchamiento, ya que estos muestran la capacidad de responder a cambios en su ambiente externo específicamente la temperatura, lo cual los coloca como materiales inteligentes.

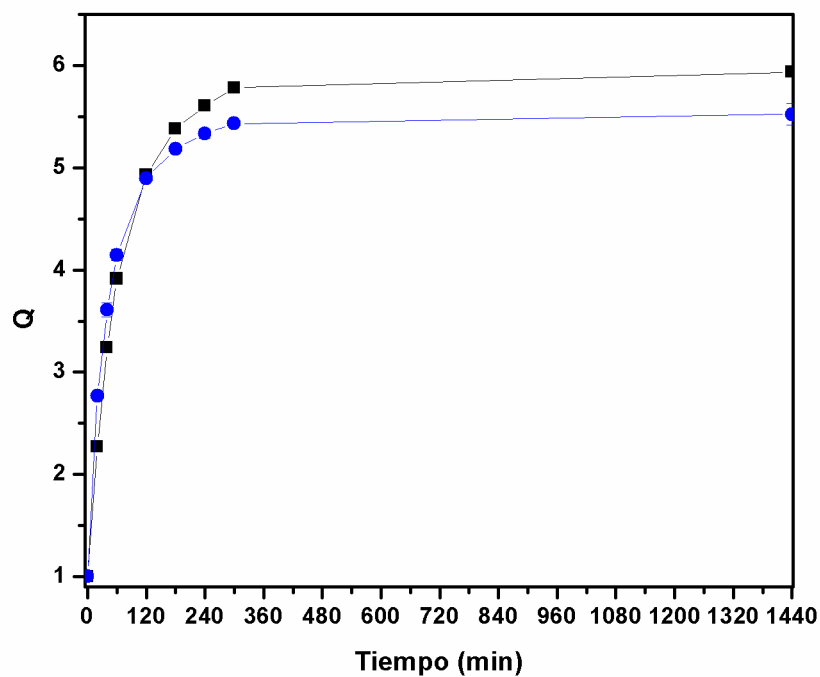


Figura 21. Gráfica del grado de hinchamiento NIPAAm/DMA (10%) (—●—), NIPAAm/DMA (20%) (—■—), a diferentes tiempo a 25°C.

En la Figura 21 se muestra el comportamiento muy similar de los hidrogeles de NIPAAm/DMA (10% y 20%), diferenciándose en que el hidrogel de NIPAAm/DMA (20%) logra un grado de hinchamiento mayor siendo este de 5.9, y el gel NIPAAm/DMA (10%) llega a un máximo 5.4, mostrando una pequeña diferencia la cual se piensa que es debido a la cantidad de DMA contenido en el gel

V.3.3 Estudios de cinética de colapso

El estudio nos muestra el comportamiento de los geles con respecto al momento de colapso, los datos obtenidos se transforman a grado de hinchamiento para así ser estudiados. Estos hidrogeles se mantienen en hinchamiento 24 horas a 4°C antes de este estudio para garantizar su máximo hinchamiento y iniciando el estudio a 42°C.

Este estudio se basa en el comparativo del peso del gel hinchado a su máxima capacidad y el tiempo que se demora en colapsar a su máximo, nos indica que entre menor sea el Q su capacidad de colapso es mayor ya que logra reducir su tamaño de forma más significativa.

En la Figura 22 se muestra el comportamiento de los hidrogeles de NIPAAm/DMA (10% y 20%) en el cual se observa el proceso de colapso a través del tiempo mostrando que ambos hidrogeles continúan con un comportamiento similar, dando como resultado que el hidrogel que contiene 10% DMA muestra una mayor capacidad de colapso llegando hasta 0.42, mientras que el que contiene 20% DMA muestra un menor colapso de 0.47, lo cual es congruente con ya que la disminución de NIPAAm disminuye la capacidad de colapso.

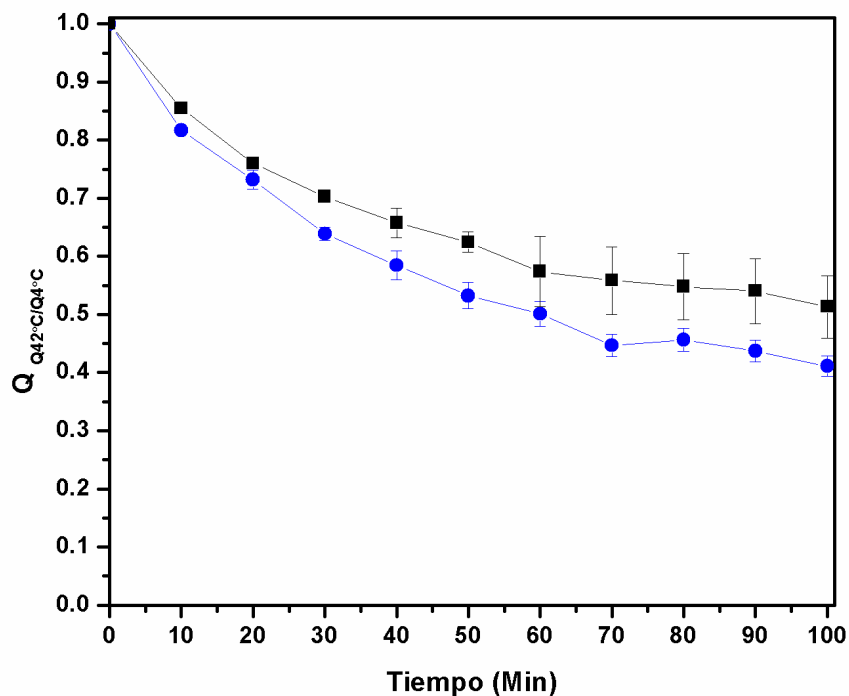


Figura 22.- Gráfica del grado de colapso de NIPAAm/DMA (10%) (—●—), NIPAAm/DMA (20%) (—■—), a diferentes tiempo a 42°C.

Estos datos nos llevan a elegir el hidrogel de NIPAAm/DMA (20%), ya que presenta una temperatura de transición cercana a 42°C y mantiene un buen comportamiento en el hinchamiento y colapso lo que nos da un indicio de continuar modificando este tipo de hidrogel.

V.4. PREPARACIÓN DE HIDROGELES DE NIPAAm/DMA(20%) con MP's

Se elaboran 5 tipos de hidrogeles que contienen micropartículas de los cuales se analizarán de igual manera. Estos hidrogeles al ser secados mostraron coloración blanca

en diferentes tonalidades dependiendo de la cantidad de micropartículas que son agregadas, dando un blanco opaco al hidrogel con mayor cantidad de MP's.

V.4.1. Estudios de la cinética de hinchamiento

Se realizó el procedimiento de cinética de hinchamiento para los 5 hidrogeles como se observa en la Figura 23, en el cual se ve reflejada que capacidad de hinchamiento de los geles depende de la cantidad y tipo de hidrogeles cambia, mostrando una tendencia en la rapidez y capacidad de hinchamiento, siendo el hidrogel NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP de NIPAAm y 15%MP NIPAAm/AAm(15%) los hidrogeles con una menor capacidad de hinchamiento llegando tan solo a 6.

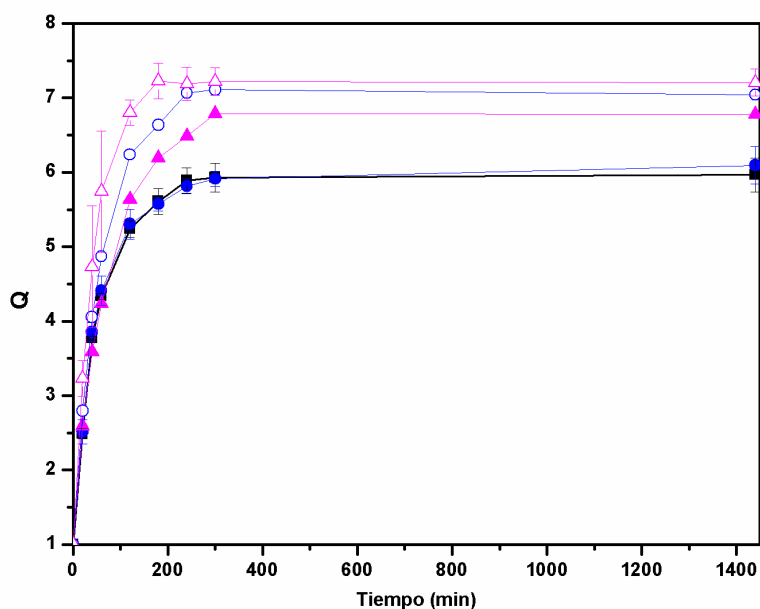


Figura 23.- Gráfica del grado de hinchamiento del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (■), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (●), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (▲), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (○), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (△) a 25°C a diferentes tiempos.

Mientras tanto el gel 15%MP NIPAAm/DMA(20%) se mantiene en medio de la gráfica logrando alcanzar cerca de un 6.6, y siendo finalmente los últimos dos hidrogeles los que alcanzan un mayor grado de hinchamiento arriba de 7, diferenciándose en la rapidez del hinchamiento ya que el hidrogel que contiene 30%MP NIPAAm/AAm(20%) es más rápido en alcanzar su punto máximo, lo que nos indica que la mayor cantidad de micropartículas y sumándole el mayor porcentaje de acrilamida nos brinda este comportamiento favorable.

V.4.2. Estudio de la cinética de colapso

Este estudio nos indica la capacidad de colapso de los hidrogeles estos siendo colapsados a 42°C, modificando la temperatura de hinchamiento en la cual serán estudiadas 25°C y 37°C, para mostrar la capacidad de colapso en ambas condiciones.

El primer experimento se realizó hinchando el gel a 25°C por 24 horas, y se procedió al estudio de su cinética de colapso colocándolo a 42°C y procediendo a muestrear a diferentes tiempos los datos obtenidos se representan en la Figura 24. Esta gráfica nos muestra un comportamiento similar en todos los hidrogeles con excepción del NIPAAm/DMA(20%) con 15% MP NIPAAm/AAm(15%) el cual muestra un comportamiento que altera el patrón de los mismos dando un colapso continuo sin ser drástico, sin embargo este llega a un colapso similar al del resto.

El gel con 15% MP de NIPAAm muestran su máximo colapso cercano a 0.25, ahí continuando con 30% MP de NIPAAm/AAm(15%) de 0.3, 15% MP NIPAAm/AAm(20%) con un 3.5, y finalmente el de menor colapso el gel que contiene 30%MP NIPAAm/AAm(20%)

que solo alcanza un 0.45 de colapso, sin embargo 4 hidrogeles se comportan de igual manera al colapsar en los primeros 10 minutos del estudio siendo este su mayor colapso.

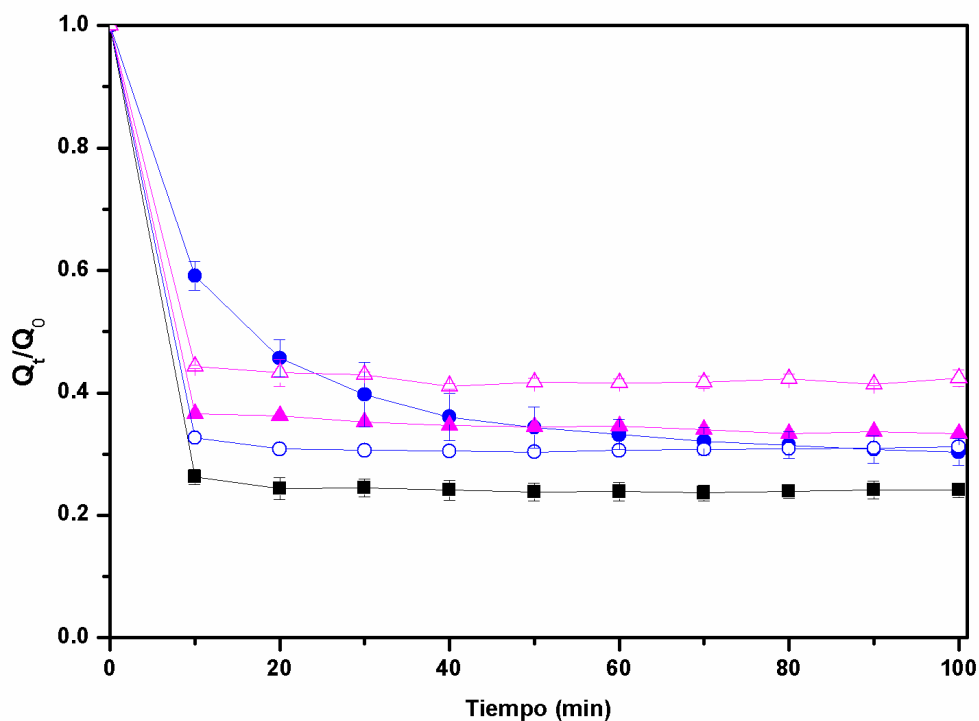


Figura 24.- Cinética de colapso del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (■), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (●), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (▲), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (○), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (△) con hinchamiento a 25°C y colapso a 42°C a diferentes tiempos.

El segundo estudio se coloca en hinchamiento a 37°C por 24 horas y se procede al estudio a 42°C los datos obtenidos se muestran en la figura 25, en la cual se observa un comportamiento similar en 4 de los hidrogeles los cuales logran un colapso de 0.6 logrando su máximo colapso en los primero 10 min, sin embargo el hidrogel que contiene

15%MP NIPAAm/AAm(15%) mantiene un comportamiento continuo lo cual se presume que se debe a una mala distribución de micropartículas alterando el comportamiento del hidrogel.

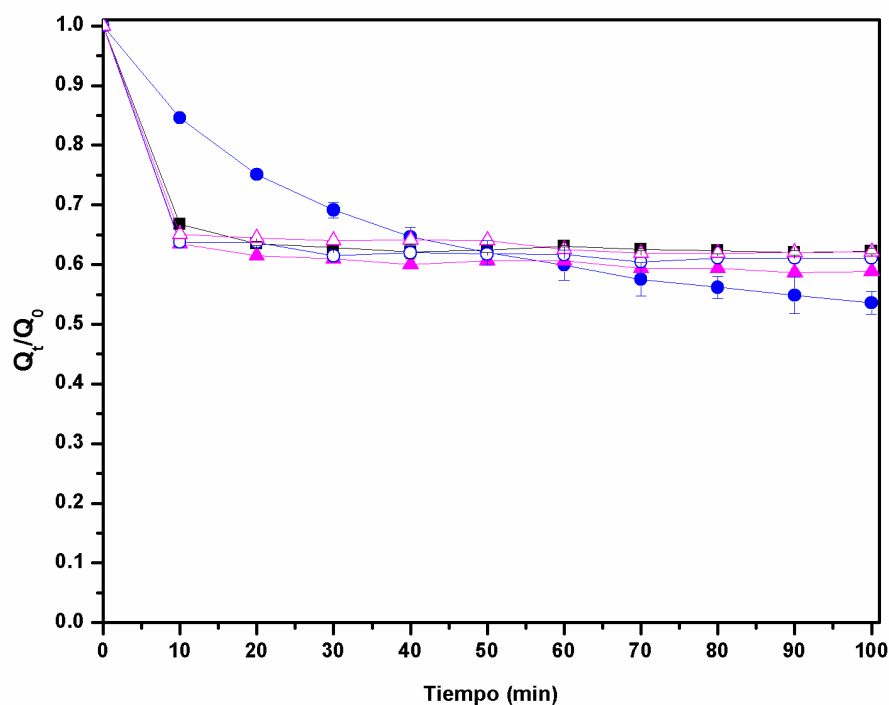


Figura 25.- Cinética de colapso del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (■), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (●), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (▲), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (○), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (△) con hinchamiento a 37°C y colapso 42°C a diferentes tiempos.

Con este comparativo de colapso a diferentes temperaturas nos da un indicio del comportamiento futuro de los hidrogeles, con esto nos demuestra que los hidrogeles logran un mayor colapso a 25°C debido que en esta temperatura se tiene el hinchamiento total de NIPAAm ya que esta se da por debajo de 32°C y por siguiente el estudio que se

realiza a 37°C, sufre un menor colapso ya que el hidrogel no se encuentra en temperatura óptima para llegar a lograr un colapso mayor.

V.4.3. Estudio de cinética de colapso/hinchamiento

Este experimento se realizó con la intención de demostrar que el proceso de colapso e hinchamiento de los geles es reversible, esto con el fin de demostrar si se comportan de la misma forma, lo cual nos mostraría que el gel tiene capacidad de mantener su forma aun pasando por estos ciclos de hinchamiento y colapso sin sufrir ninguna deformación en el gel. Estos experimentos se llevaron a cabo a dos diferentes temperaturas para así observar las diferencias entre ellos, siendo estos hinchados a 25°C y colapsados a 42°C, y el siguiente de 37°C a 42°C, para con ellos demostrar el comportamiento de ellos y su capacidad de hinchamiento.

El primer estudio se realizó de 25°C a 42°C, colocando en un medio de liberación de 3ml y siendo pesados cada 15 min, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26 para los 5 diferentes hidrogeles estudiados, en los cuales se observa un colapso drástico observado anteriormente siendo el hidrogel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP de NIPAAm el que logra una mayor colapso llegando a 0.3 en el grado de hinchamiento y a su vez el que contiene 15%MP NIPAAm/AAm(15%) el que muestra un colapso menor y es paulatino siendo este de 0.4 al momento de llegar a la hora de muestreo, el resto de los hidrogeles logran una similitud en sus colapsos siendo estos dentro de la primera muestra que se realizó a los 15 min siendo entre 0.3 y 0.4, sin embargo el colapso se manifiesta de manera instantánea al contacto con el medio a 42°C, estos mismos se muestran en el

cambio al medio de 25°C y se observa un hinchamiento de manera progresiva durante la hora que se encuentran en esta temperatura, donde no se observa una diferencia entre los geles siguiendo todos un mismo comportamiento llegando a un máximo de entre 0.6 y 0.65.

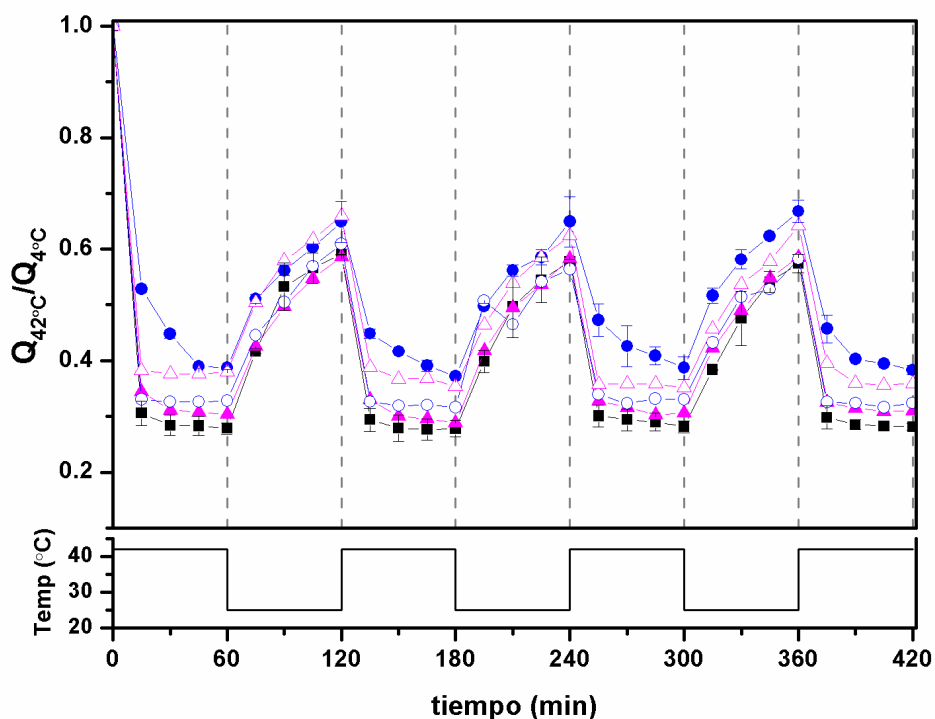


Figura 26.- Cinética de colapso/hinchamiento del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (—■—), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (—●—), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (—▲—), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (—○—), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (—△—) en ciclos de temperatura de 25°C y 42°C a diferentes tiempos.

El segundo estudio se realizo de la misma manera solamente modificando la temperatura de hinchamiento siendo a 37°C y colapsando a 42°C, en la Figura 27 se muestra la gráfica representando los resultados obtenidos donde observamos que el

hidrogel con menos colapso es el que contiene 15%MP NIPAAm, esto se lo adjudicamos al que al momento de ser hinchado a 37°C las micropartículas ya se encuentran colapsadas y esto nos da un menor colapso, mientras tanto los hidrogeles de 15%MP NIPAAm/AAm(20%), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) y 30%MP NIPAAm/AAm(20%) al momento del colapso se muestran un comportamiento similar llegando a un 0.6.

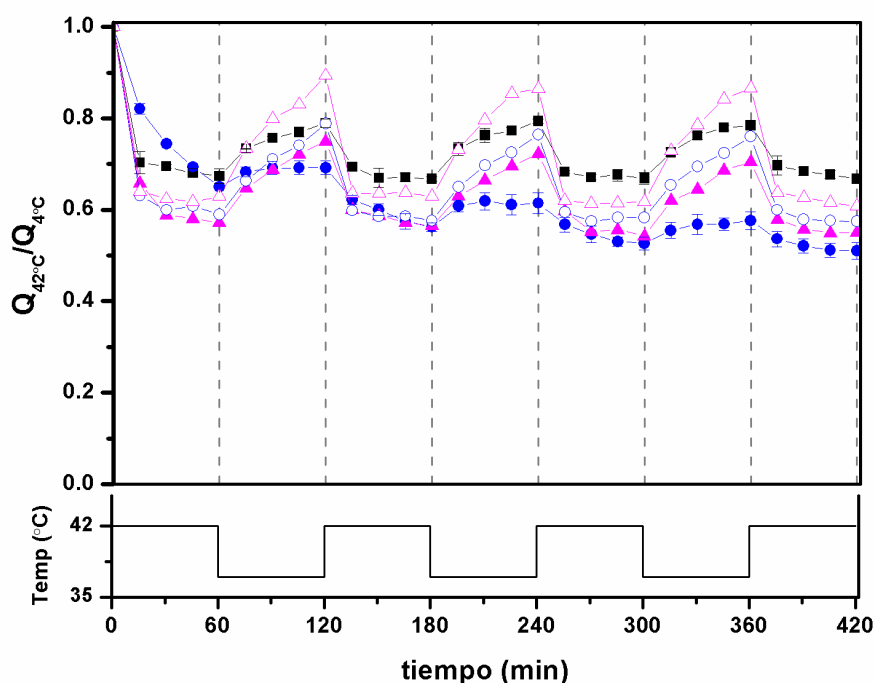


Figura 27.- Cinética de colapso/hinchamiento del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (—■—), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (—●—), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (—▲—), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (—○—), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (—△—) en ciclos de temperatura de 37°C y 42°C a diferentes tiempos

Sin embargo, al momento del hinchamiento el hidrogel de 30%MP NIPAAm/AAm(20%) llega 0.9, mientras que el hidrogel de 30%MP NIPAAm/AAm(15%) alcanza un 0.8 y por último el hidrogel de 15%MP NIPAAm/AAm(15%) llegando a un 0.72,

esto comprueba que la cantidad de micropartículas y la composición de las mismas si le dan diferencias en las capacidades de respuesta sin embargo estas no son muy marcadas, sin embargo todas las anteriores muestran y mantienen su forma.

Este estudio nos demuestra que los hidrogeles tienen la capacidad de colapsar e hincharse a diferentes temperaturas sin llegar a causar ninguna deformación en su estructura, comprobando que esto se puede realizar en múltiples ocasiones, sin embargo se observa un diferencia marcada en las capacidades de colapso siendo mayor a temperatura de 25°C llegando a 0.3, esto debido a la cantidad de NIPAAm que contienen y corroborando que estos por arriba de 32°C en esta ocasión de 37°C su colapso es pobre de 0.6 pero este se lleva a cabo siendo significativo para continuar estudiando este comportamiento.

V.5. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS

Para realizar el estudio de estas liberaciones lo primero fue realizar una curva de calibración de cada molécula que será liberada, en este caso la vitamina B12 que tiene un peso molecular de 1335 Da, Citocromo C con un peso de 12,000 Da, y Albúmina con la que posteriormente se determinó la fracción liberada de la macromolécula.

V.5.1. LIBERACIÓN DE HIDROGELES CON VIT B12

V.5.1.1. Concentración de cargado Vitamina B 12

La concentración que fue cargada en cada hidrogel depende de la temperatura en el que se lleva a cabo el procedimiento, los datos se reportan en la tabla 8.

Tabla 8.- Contenido de cargado de Vit B12 en cada hidrogel de NIPAAm/DMA(20%) con las diferentes MP's y temperatura de cargado.

Gel NIPAAm/DMA(20%) con MP's		mg de Vit B12/ g de gel
Cargado a 25°C	15% NIPAAm	0.69
	15% NIPAAm/Aam(15%)	0.59
	15% NIPAAm/Aam(20%)	0.54
	30% NIPAAm/Aam(15%)	0.69
	30% NIPAAm/Aam(20%)	0.67
Cargado a 32°C	15% NIPAAm	0.34
	15% NIPAAm/Aam(15%)	0.65
	15% NIPAAm/Aam(20%)	0.47
	30% NIPAAm/Aam(15%)	0.69
	30% NIPAAm/Aam(20%)	0.55

Los hidrogeles cargados presentan valores similares debido a que todos se encuentran en estado de hinchamiento, sin embargo muestra una diferencia el hidrogel que contiene 15% MP NIPAAm las cuales tienen su colapso a 32°C y manifiestan una baja capacidad de cargado ya que se encuentran en un ligero colapso. Estos hidrogeles continúan con su estudio en los métodos de liberación.

V.5.1.2. Estudio de liberación de Vitamina B 12

La cinética de liberación se llevó a cabo de manera *in vitro* siendo estos en ciclos de temperatura, de los cuales se realizaron dos estudios uno de 25°C a 42°C y el siguiente de 37°C a 42°C, todos los datos obtenidos se transformaron mediante el cálculo de la

fracción liberada de la Ecuación 3, donde F_t es la fracción liberada, M_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t y M_∞ es la cantidad total de fármaco en el gel.

$$F_t = \frac{M_t}{M_\infty}$$

Ecuación 3. Fracción liberada

La primera liberación se basó en las temperaturas de 25°C a 42°C, de la cual se muestra en la Figura 28 los resultados, en la cual se observa el comportamiento de los hidrogeles a lo largo del tiempo de la liberación, donde se muestra que los hidrogeles de NIPAAm/DMA(20%) con diferentes MP's se comportan de manera similar durante la primera hora de muestreo a temperatura de 25°C donde logran liberar por encima del 0.7 de contenido, pero observando ligeros cambios al momento del cambio de temperatura a 42°C donde se observan 3 grupos, el primero los que contienen 15%MP NIPAAm/AAm(15%) y 15%MP NIPAAm/AAm(20%) muestran su comportamiento igual observando un ligero salto al momento de la contracción pero siendo estos los de menor liberación a 42°C llegando a 0.85 pero logrando liberar el 0.98 de su contenido. En segundo se observa al gel que contiene 15% MP NIPAAm el cual responde al cambio de temperatura mostrando un aumento en la liberación al colapsar, sin embargo los hidrogeles con 30% MP NIPAAm/AAm(15%) y 30%MP NIPAAm/AAm(20%) muestran una mayor capacidad de liberación ante el cambio de temperatura y logran cerca del 0.99 de liberación total del contenido al momento de concluir con su colapso.

Estos hidrogeles lograron cargar cerca de 0.64mg/ml en promedio lo cual nos demuestra que la composición de los mismos no modifica ni influyen en el cargado.

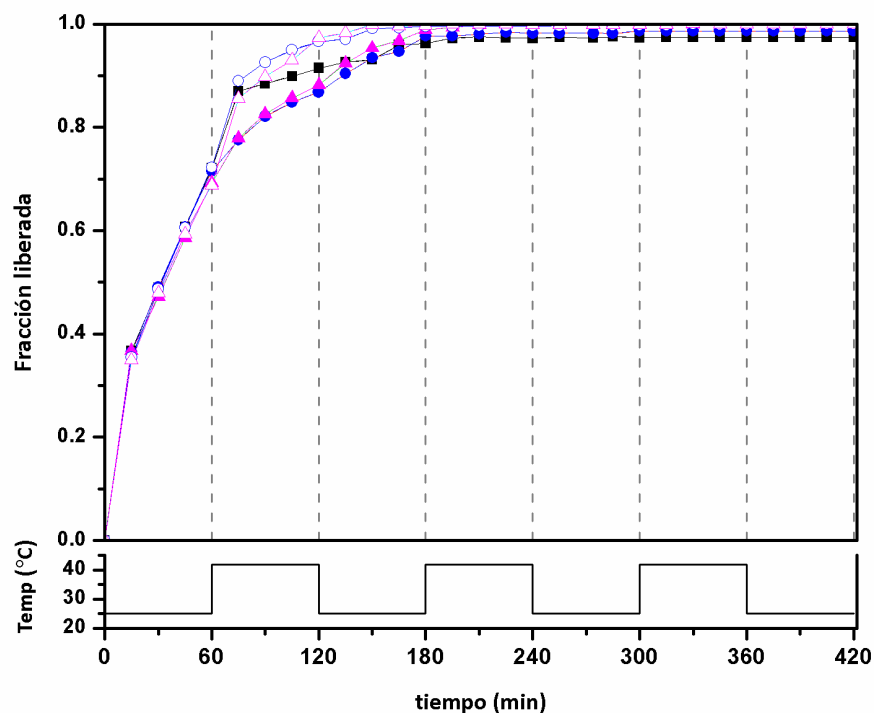


Figura 28.- Cinética de liberación de Vitamina B12 del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (—■—), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (—●—), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (—▲—), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (—○—), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (—△—) en ciclos de temperatura de 25°C y 42°C a diferentes tiempos

El segundo estudio se realizó en ciclos de 37°C a 42°C, con hidrogeles de NIPAAm/DMA(20%) con las diferentes micropartículas. En la Figura 29 se observa que en la primer hora donde estos hidrogeles se encuentran a 37°C se forma dos grupos primero los hidrogeles que contiene 15%MP NIPAAm, 15%MP NIPAAm/AAm(15%) y 30%MP NIPAAm(20%) muestra el comportamiento más lento, ya que liberan cerca del 0.7 del

contenido dentro de esta temperatura, mientras que los hidrogeles de 15%MP NIPAAm/AAm(20%) y 30%MP NIPAAm/AAm(15%) muestran una mayor liberación a 37°C donde alcanzan alrededor de 0.8.

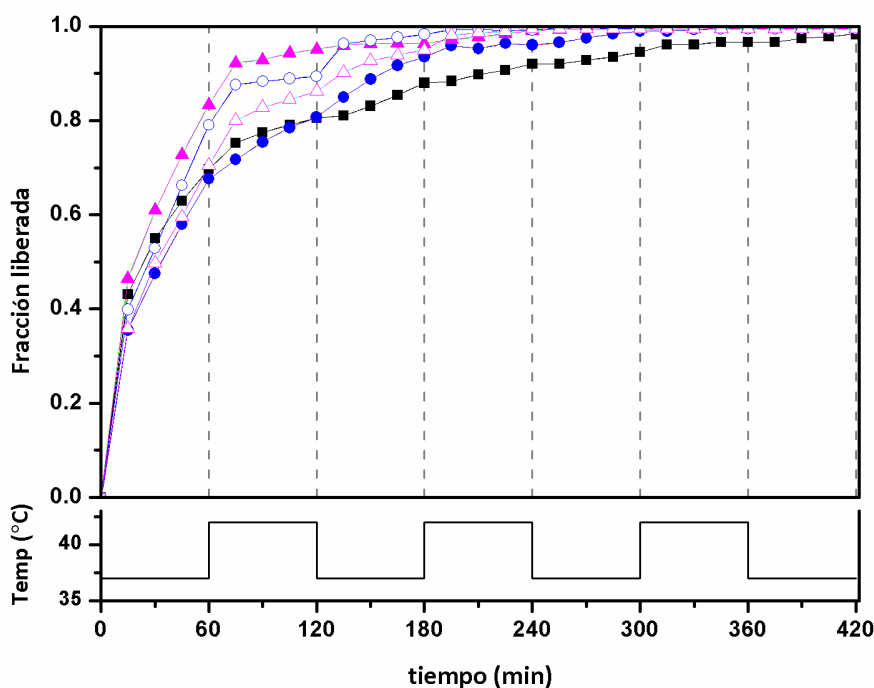


Figura 29.- Cinética de liberación de Vitamina B12 del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (—■—), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (—●—), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (—▲—), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (—○—), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (—△—) en ciclos de temperatura de 37°C y 42°C a diferentes tiempos

Sin embargo, al colocar la temperatura a 42°C se observó un cambio en el comportamiento mostrando una disminución en la liberación lo que nos indica que el hidrogel está dejando de liberar a esta temperatura, sin embargo al momento de cambiar nuevamente la temperatura nos muestra nuevos datos sobresalientes, observándose el aumento en la liberación llegando a alcanzar casi la totalidad de liberación del contenido.

Estos hidrogeles nos muestran que liberan a temperatura menor a 42°C, y la mayor parte del contenido en la primera hora de liberación.

Todos estos hidrogeles que se estudiaron en ambas temperaturas tuvieron una capacidad de cargado cerca de 0.6 mg/ml, sin embargo a 32°C el hidrogel que contiene 15%MP NIPAAm solo llego a la mitad siendo de 0.34mg/ml, esto nos muestra que las micropartículas se encuentran colapsadas y esto juega una papel muy importante ya que al estar colapsadas lo poros se encuentran abiertos y el contenido no es retenido dentro del hidrogel y esto juega un papel importante sobre el cargado.

Con los estudios realizados en estos hidrogeles podemos observar que la molécula de Vitamina B12 puede ser muy pequeña y con esto colaborar en su fácil liberación, con lo cual los sistemas en esta molécula no muestran un control sobre su liberación, sin embargo nos indica que estos hidrogeles si tienen la capacidad de cargar y liberar por lo que se procede al estudio de cargado con una molécula con mayor peso molecular.

V.5.2. LIBERACIÓN DE HIDROGELES CON CITOCROMO C

V.5.2.1. Concentración de cargado de Citocromo C

El cargado de esta macromolécula se realizo de la misma manera que Vitamina B12, en la tabla 9 se observa el contenido de cargado de cada hidrogel conociendo su concentración, esto es mostrado dependiendo de la temperatura en la que estos van a ser liberados.

Tabla 9.- Contenido de cargado de Cit C en cada hidrogel de NIPAAm/DMA(20%) con las diferentes MP's y temperatura de cargado.

Gel NIPAAm/DMA(20%) con MP's		mg Cit C/ g de gel
Cargado a 25°C	15% NIPAAm	1.33
	15% NIPAAm/Aam(15%)	1.15
	15% NIPAAm/Aam(20%)	1.52
	30% NIPAAm/Aam(15%)	1.69
	30% NIPAAm/Aam(20%)	1.4
Cargado a 32°C	15% NIPAAm	0.78
	15% NIPAAm/Aam(15%)	1
	15% NIPAAm/Aam(20%)	2.16
	30% NIPAAm/Aam(15%)	2.75
	30% NIPAAm/Aam(20%)	2.51

Los hidrogeles cargados con Cit C nos demuestran una diferencia entre las concentraciones de cargado dependiendo de la temperatura, observándose bajas a 25°C y con un aumento significativo al ser cargadas a 32°C, discrepando el hidrogel de 15%MP NIPAAm ya que a esta temperatura de manifiesta que las micropartículas se encuentran de forma colapsado lo que nos da una menor capacidad para cargar la macromolécula.

Comparando con los datos anteriores nos muestra que una molécula de mayor peso molecular puede ser capaz de cargarse en un hidrogel dependiendo de su composición, y con ello estudiar su comportamiento ante la liberación de estos.

V.5.2.2. Estudio de liberación de Citocromo C

La cinética de liberación se llevó a cabo de igual manera que la de Vit B12, de manera *in vitro* y siguiendo los ciclos de temperatura, siendo dos estudios uno de 25°C a

42°C y el siguiente de 37°C a 42°C, se analizaron los datos con la ecuación 3 antes descrita.

En la Figura 30 nos muestra los resultados de los hidrogeles de NIPAAm/DMA(20%) con diferentes micropartículas en el ciclo de 25°C a 42°C, donde observamos un comportamiento similar durante la primera hora de muestreo ya que estos liberan menos del 0.5 de la fracción total siendo el de mayor liberación el de 15%MP NIPAAm/AAm(15%), mientras que en la segunda hora en el cambio de temperatura a 42°C todos los hidrogeles se observa un pulso al momento del colapso del hidrogel mostrando un aumento significativo siendo el hidrogel con 15%MP NIPAAm el que logra alcanzar el 0.73 de la liberación, seguido de 30%MP NIPAAm/AAm(20%), 30%MP NIPAAm/AAm(15%), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) y como el de liberación mas baja 15%MP NIPAAm/AAm(15%) mostrándonos que las micropartículas influyen en la liberación mostrando que entre mayor sea mejor control ante el cambio de temperatura, sin embargo en la tercera hora de muestreo se observa un incremento a 25°C donde todos continúan con su liberación a través de las horas donde el hidrogel de 30%MP NIPAAm/AAm(20%) llega a liberar el total de su contenido en las 7 horas, y siguiendo el resto de los hidrogeles que llegan a un máximo del 0.95 al termino de las 7 horas de muestreo, todos estos hidrogeles nos muestran de igual manera una liberación sostenida a lo largo de las 7 horas de muestreo en la liberación.

El hidrogel 15%MP NIPAAm muestra un interesante comportamiento en su liberación donde en las primeras horas responde de una buena manera al cambio de

temperatura ya que al colapsar logra producir un buen pulso de liberación, sin embargo solo es un pulso no son repetitivos. Todos estos hidrogeles logran cargar una cantidad similar de Cit C dentro de su interior por lo que el cargado no es influenciado por la composición del mismo en esta temperatura.

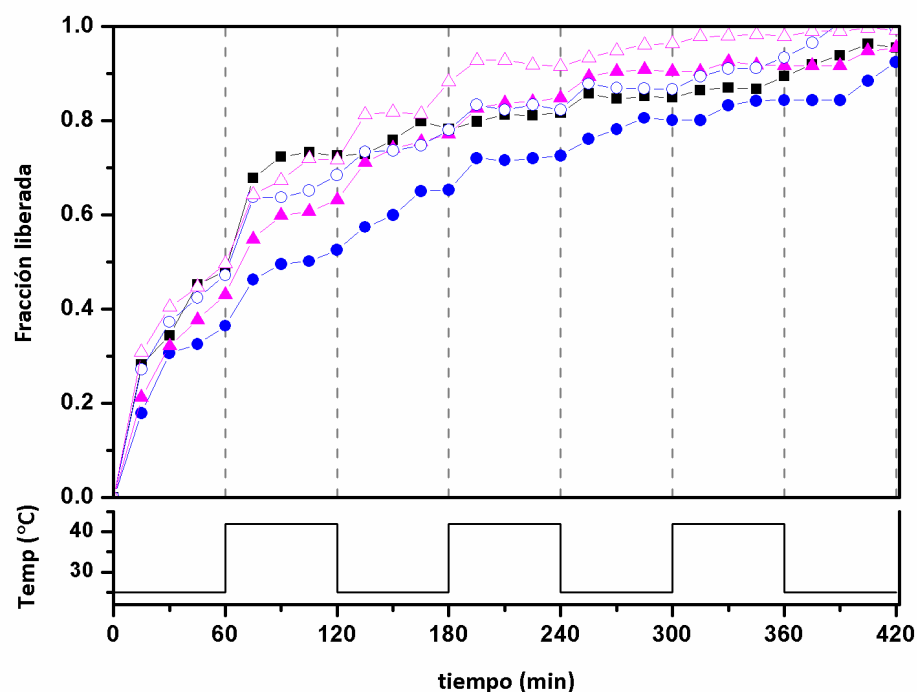


Figura 30.- Cinética de liberación de Citocromo C del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (—■—), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (—●—), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (—▲—), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (—○—), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (—△—) en ciclos de temperatura de 25°C y 42°C a diferentes tiempos

En el segundo estudio realizado de la liberación de Cit C en ciclos de temperatura de 37°C y 42°C se muestra en la Figura 31 en el cual se observa el gel de NIPAAm/DMA(20%) con diferentes micropartículas, de los cuales se observa de manera

muy marcada la diferencia de liberación dependiendo del tipo de micropartículas que contiene cada hidrogel, iniciando con el hidrogel que contiene 15% NIPAAm el cual logra nos muestra su rápida liberación en 60 min a 37°C logrado liberar el 0.7 del total de su contenido, en las horas posteriores se observa un bloqueo de la liberación a 37°C debido a que el hidrogel se encuentra en hinchamiento mientras que muestra una ligera reacción ante el colapso del gel a 42°C donde aumenta la liberación de macromolécula de citocromo C donde muestra que el colapso del hidrogel impulsa la liberación.

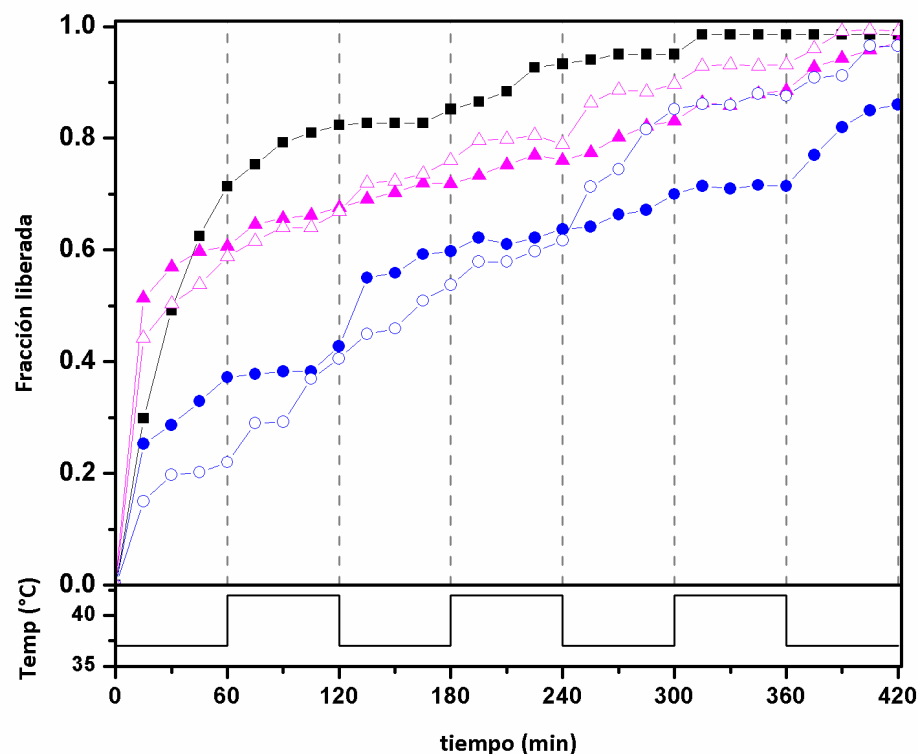


Figura 31.- Cinética de liberación de Citocromo C del gel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm (■), 15%MP NIPAAm/AAm(15%) (●), 15%MP NIPAAm/AAm(20%) (▲), 30%MP NIPAAm/AAm(15%) (○), 30%MP NIPAAm/AAm(20%) (△) en ciclos de temperatura de 37°C y 42°C a diferentes tiempos

Continuando con los hidrogeles de 15%MP NIPAAm/AAm(20%) y 30%MP NIPAAm/AAm(20%) este sigue un mismo patrón donde se observa una liberación rápida en la primera hora donde se libera el 0.6 del contenido, continuando con una liberación sostenida a lo largo de las 7 horas de muestreo, observando que no existe ninguna respuesta ante los estímulos del cambio de temperatura.

Continuando con 15%MP NIPAAm/AAm(15%) el cual muestra una menor liberación en el primer ciclo siendo esta de 0.38 y mostrando una pobre liberación al momento de su colapso pero el fenómeno de hinchamiento le permite lograr una liberación del 0.85 durante las 7 horas de muestreo, terminando con el hidrogel de 30%MP NIPAAm/AAm(15%) el cual muestra una liberación mucho más lenta, logrando liberar en su primera hora el 0.2 y teniendo una respuesta ante el colapso del hidrogel, sin embargo este comportamiento se presenta a lo largo de los cambios de temperatura a los que son sometidos sin ser determinante la temperatura en la que este se encuentre hasta llegar a su máxima liberación de 0.95 a las 7 horas de muestreo.

El comportamiento de los hidrogeles nos demuestra que dependiendo de las condiciones con las que los manejemos somos capaces de modificar y adaptar su funcionamiento, sin embargo los estudios realizados nos muestran que este sistema no está completamente regido por la respuesta al estímulo de la temperatura como se pretende, mientras tanto con ellos se puede llegar a consolidar un sistema de liberación modificada. El hidrogel que contiene 15%MP NIPAAm nos muestra que es un hidrogel que puede continuar su estudio con diferentes macromoléculas debido a que muestra muy

buenas condiciones ante los cambios de temperatura que el resto no muestra esto es debido a su micropartículas que no se encuentran ajustadas.

V.5.3. Liberación de hidrogeles con Albúmina

Esta liberación se realiza con hidrogeles de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm, lo cuales son cargados a 32°C con dos concentraciones de albúmina marcada siendo estas de 6.6mg/ml y de 29.8mg/ml liberados a diferentes temperaturas.

V.5.3.1. Concentración de cargado de Albúmina

La concentración de cargado a 32°C para cada hidrogel mostrado en la tabla 10.

Tabla 10.- concentración de cargado de albúmina marcada.

Gel		mg de albúmina/ g de gel
Cargado con 6.6 mg/ml	NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm	2.04
	NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm	1.91
	NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm	1.86
Cargado con 29.8 mg/ml	NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm	5.79

V.5.3.2. Estudio de liberación de Albúmina

Este estudio inicia con la liberación de albúmina a 37°C el cual contiene un total de 2.04 mg/ml de albúmina marcada, este muestreo es por 24 horas mostrando resultados

en la Figura 32 el hidrogel se comporta liberando su contenido de forma sostenida, mostrando que al momento de colocar el hidrogel en el medio el hidrogel presenta una liberación lenta y controlada, ya que con el paso del tiempo este logra ir liberando hasta llegar a las 4 horas de muestreo donde alcanza el 0.9 de liberación.

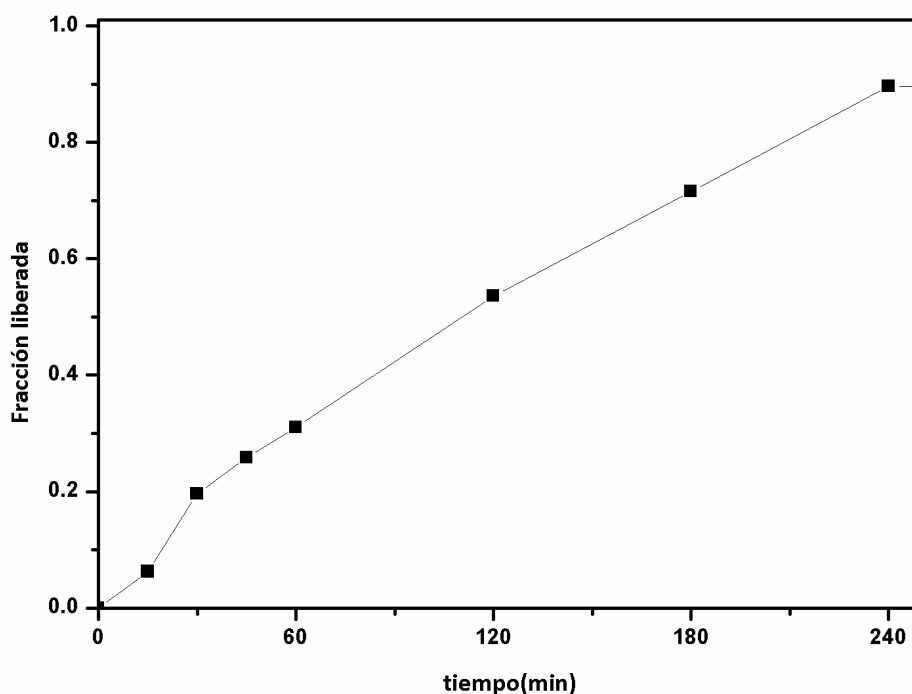


Figura 32. Gráfica de liberación de albúmina marcada a 37°C.

Continuando con los estudios se procedió a la liberación en ciclos iniciando con la liberación de 25 a 42°C mostrando resultados en la Figura 33, en la cual observamos que esta inicia liberando una pequeña cantidad a lo largo de los primeros 45 min, sin embargo al llegar a la hora de muestreo presenta una liberación busca llegando al 0.55 del contenido total, al momento del cambio de temperatura a 42°C muestra la liberación al

colapso del gel llegando a un 0.8 y continuando con su liberación a través del tiempo de muestreo con un máximo de liberación del 0.9 a 4 horas de liberación. Lo que nos indica que el hidrogel está reaccionando al cambio de temperatura mostrando la influencia de las micropartículas.

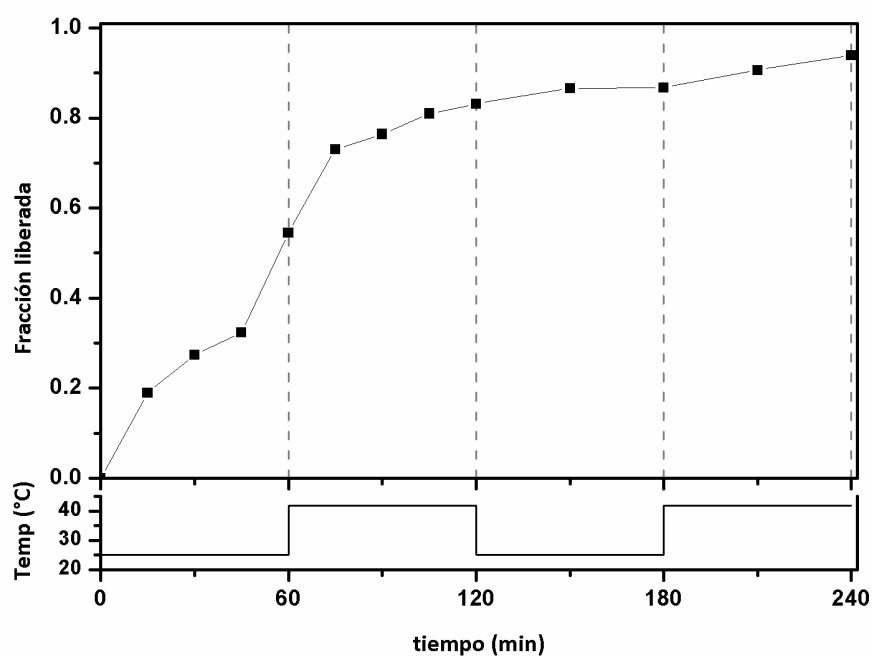


Figura 33. Gráfica de liberación de albúmina marcada en ciclos de temperatura de 25°C a 42°C.

Continuando con la liberación en ciclo se realiza en temperatura de 37°C a 42°C mostrado en la Figura 34, en esta se muestra una liberación mayor en la primera hora llegando arriba de 0.6 del contenido del gel, mostrando un incremento al momento del cambio de temperatura pero sin ser tan marcado, y continuando con su liberación de manera continua llegando a un 0.95 de su totalidad en 4 horas.

Comparando los resultados en la liberación a diferentes ciclos de temperaturas observamos una mínima diferencia en el porcentaje de cargado el cual se realiza a la misma temperatura, sin embargo podemos observar la diferencia en la cantidad de liberación en la primera hora siendo mayor a temperatura de 37°C llegando a 0.65 en comparación a 25°C que alcanza 0.5 de su contenido, lo que nos demuestra que influye en la liberación de macromoléculas las micropartículas y el ajuste de temperatura del hidrogel ya que provocan un efecto favorable al colapsar y con ello aumentar el contenido del hidrogel.

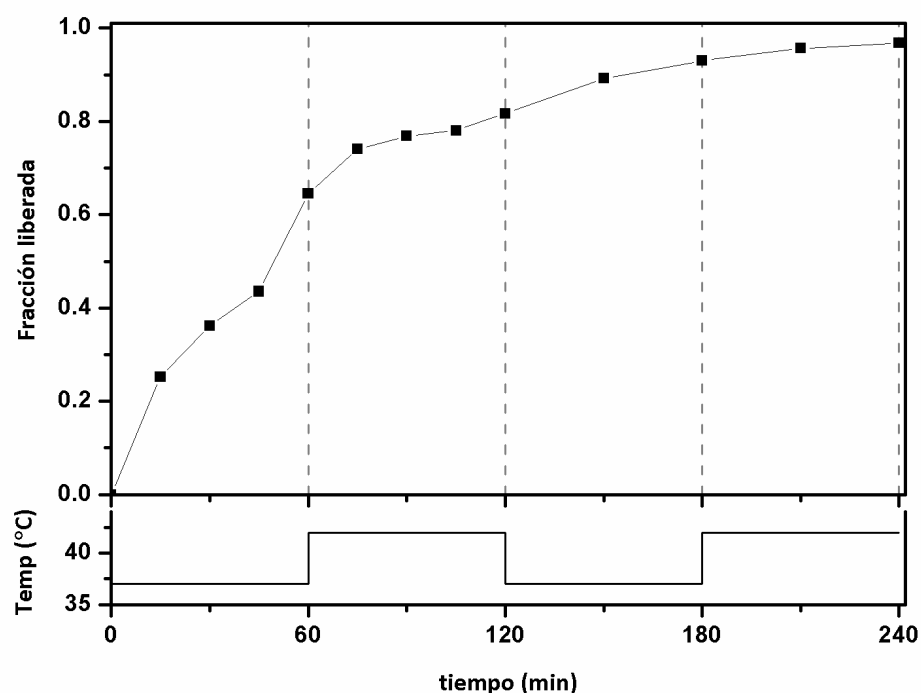


Figura 34. Gráfica de liberación de albúmina marcada en ciclos de temperatura de 37°C a 42°C.

Se procedió al cargado de un hidrogel con una solución de mayor concentración (29.8 mg/ml) a 32°C y fue liberado a 37°C observándose en la Figura 35, la cual en la primera hora de muestreo logra 0.22 del contenido manifestando una linealidad en su liberación, sin embargo en el transcurso del tiempo se muestra una disminución en la cantidad de liberación pero llegando a ser constante en las horas restantes, en liberación se muestreo por 4 horas y se tomo una última alícuota al llegar a 24 horas donde muestra el total de liberación.

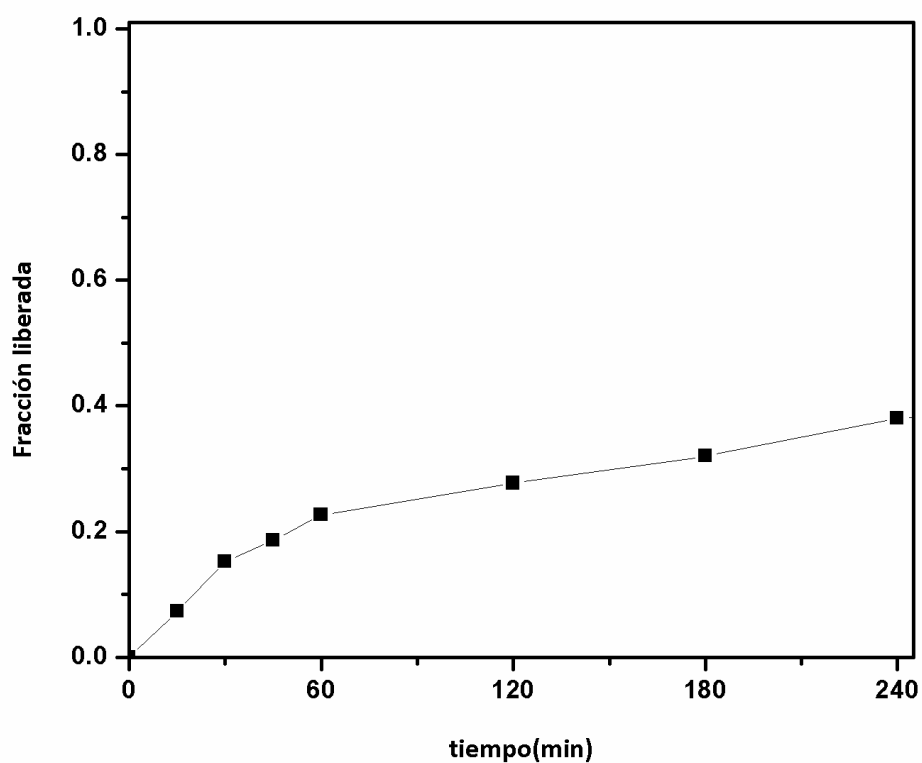


Figura 35. Gráfica de liberación de albúmina marcada a 37°C

Estos estudios nos muestran un gran resultado al mostrar que los hidrogeles pueden cargar y liberar una macromolécula como albumina, sin embargo esta no logra manifestar una respuesta ante la temperatura tan marcada como para ser llamada pulsátil.

El trabajo nos muestra la capacidad que presentan los materiales en estudio de exhibir cambios frente a factores ambientales como la temperatura, y con esto pueden llegar a ser modificados para incrementar sus propiedades de interés y poder utilizarlos para diferentes campos de la ciencia, el de principal interés se muestra en la investigación de este monómero para lograr utilizarlos como nuevos sistemas de liberación mejorados en el cual muestra la capacidad de cargar y liberar macromoléculas.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar diferentes tipos de micropartículas de NIPAAm, copolimerizadas con acrilamida y *N,N*-dimetilacrilamida con lo cual se lograron diferentes ajustes de temperatura, de la cual se eligieron tres diferentes siendo NIPAAm, NIPAAm/AAm(15%) y NIPAAm/AAm(20%) con su temperatura de transición de 32°C, 38°C Y 40°C respectivamente. Se realizaron cargados de macromoléculas in situ para mejorar el cargado, esto fue bueno mientras que la liberación se vio reducida, debido a que la macromolécula queda entrecruzada al momento de la formación del hidrogel con ello bloqueando la salida, siendo esto más evidente cuando la concentración de esta es mayor.

Debido a lo anterior se busco el ajuste de temperatura del hidrogel con NIPAAm y sus copolímeros de AAm y DMA, con el estudio del hinchamiento a través de la temperatura se eligió NIPAAm/DMA(20%) por su ajuste de temperatura a 38°C, donde se analizó su capacidad de hinchamiento y colapso, siendo este último con un proceso lento pero significativo ante el cambio de temperatura. Una vez determinado el hidrogel de NIPAAm/DMA(20%) se procedió a la incorporación de las micropartículas en diferentes porcentajes siendo estos 5 hidrogeles con 15%MP NIPAAm, 15%MP NIPAAm/AAm(15%), 15%MP NIPAAm/AAm(20%), 30%MP NIPAAm(15%) y 30%MP NIPAAm/AAm(20%). Estos 5 hidrogeles fueron estudiados iniciando con su grado de hinchamiento donde los geles que contienen 30%MP muestran un mayor grado de hinchamiento seguidos de 15%MP con ajuste de temperatura y por último los de 15%MP NIPAAm, lo que nos demuestra que el grado de hinchamiento se ve afectado por la concentración de MP y es dependiente de la composición de las mismas.

Continuando con el estudio se procedió al colapso siendo este en dos diferentes temperaturas iniciando con 25°C logrando colapsar todos los geles con pequeñas diferencias siendo el gel con 15%MP NIPAAm este demostró tener una capacidad mayor ante el cambio llegando a 0.25 mientras que el resto de los geles llegan a colapsar entre 0.3 a 0.35, donde se observa un menor grado de colapso es 30%MP NIPAAm/AAm(20%) llegando solo a 0.45, lo que nos muestra una ligera diferencia. Procediendo al colapso a 37°C mostro una mínima diferencia entre ellos llegando a 0.65, donde solamente el hidrogel de 15%MP NIPAAm/AAm(15%) muestra un colapso retardado. Estos estudios nos demuestran que la capacidad de colapso se ve afectada dependiendo de la temperatura en la que se realice, debido a que a 37°C el gel ya ha iniciado su proceso de colapso por ello el colapso es menor.

Posterior a esto se realizó el estudio en ciclos de temperatura iniciando con el estudio de 25°C a 42°C, donde los hidrogeles de 15%MP NIPAAm, 15%MP NIPAAm/AAm(20%) y 30%MP NIPAAm/AAm(15%) muestran que logran un mayor colapso llegando a 0.3 con una recuperación en el hinchamiento del doble en 0.6, con los hidrogeles de 30%MP NIPAAm/AAm(20%) y 15%MP NIPAAm se ven retrasadas en su colapso siendo de menor intensidad llegando a 0.4 con una capacidad de hinchamiento de 0.65 sin embargo el gel que contiene 15%MP NIPAAm/AAm(15%), muestra un colapso lento pero llegando al mismo estado que los anteriores. Procediendo al estudio de 37°C a 42°C se analizó que el colapso se manifiesta de la misma manera que el anterior sin embargo con una menor capacidad en rango de 0.6 a 0.7, manteniendo su capacidad de

hinchamiento a 0.7 y 0.8 donde el hidrogel de 30%MP NIPAAm/AAm(20%) muestra la mayor capacidad de hinchamiento llegando a un 0.9 mostrando que la capacidad de hinchamiento es relacionada a la cantidad de MP en el hidrogel.

Las liberaciones llevadas a cabo iniciaron con Vit B12 a en ciclos de 25°C a 42°C donde los hidrogeles se comportaron de manera similar liberando el 0.7 de su contenido en la primera hora y finalizando a las 3 horas de liberación, en el ciclo de 37°C a 42°C muestran una liberación más pausada y con ligeros pulsos pero liberando su mayor parte del contenido en la primera hora, lo que nos muestra que esta molécula resulta muy pequeña para ser controlada por este sistema. Se procedió al cargado de Cit C la cual al igual se liberó en dos ciclos el primero de 25°C a 42°C mostrando una diferencia en la cinética de liberación dando diferencias mostrando pulsos ante el cambio de temperatura siendo el gel con 30%MP NIPAAm/AAm(20%) en que tiene una mayor rapidez de liberación siendo esta en 7 horas de muestreos y mostrando una liberación continua sin respuesta a los estímulos pero llegando a un 0.9 de liberación de su contenido, realizando el cambio de estudio a 37°C se muestra una liberación diferenciada por el tipo de micropartículas incorporadas, dando una liberación rápida en el caso de los geles que contienen MP NIPAAm/AAm(20%) mostrando que en 15%MP no manifiesta cambios ante los estímulos sin embargo al contener 30%MP se manifiestan pulsos ante estos cambios, mientras tanto los que contienen MP de NIPAAm/AAm(15%) muestran una liberación lenta en la cual al contener 15%MP se realiza sin reacción ante estímulos, pero el que contiene 30%MP realiza grandes reacciones ante los cambios en la temperatura, esto nos muestra

que entre mayor sea la cantidad de micropartículas en el hidrogel mejor será su comportamiento ante los estímulos. La liberación de albúmina marcada se lleva a cabo con dos concentraciones y con el hidrogel de NIPAAm/DMA(20%) con 15%MP NIPAAm la cual es cargada a 32°C y liberada a 37°C donde muestra una liberación continua a través del tiempo logrando liberar el 0.9 de su contenido en 4 horas, se llevo a cabo liberación en ciclos el primero de 25°C a 42°C donde se observa una liberación donde es marcado el cambio ante la temperatura esto nos muestra que las micropartículas al momento de su colapso ayudan a la liberación de la macromolécula llegando a un máximo de 0.9 de su contenido en 4 horas. Continuando con el cambio de temperatura a 37°C a 42°C nos muestra el mismo comportamiento solo que la liberación a 37°C logra una mayor concentración liberando el 0.63 de su contenido y continuando a 42°C con un pequeño pulso logrando llegar a 0.95 en las 4 horas de muestreo. Sin embargo cuando el hidrogel es cargado con una mayor concentración este carga mayor cantidad de macromolécula, liberando durante la primer hora el 0.22 de su contenido y el resto de manera mas retardada pero constante a través del tiempo.

Con todo lo anterior determinamos que los geles tienen la capacidad de liberar a altas temperaturas con macromoléculas, que las micropartículas y los porcentajes de estas influyen considerablemente en su comportamiento, todo esto nos da un elemento más para considerarlos como una forma de liberación por medio de pulsos, ya que se comprobó que estos se contraen rápidamente y expulsan la totalidad de la molécula a través del tiempo.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

1. José M. González Saiz, Consuelo Pizarro Millan. Geles poliméricos: aplicaciones en biotecnología (1994)
2. Alejandro Arredondo; Marta Elena Londono. Hidrogeles Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. Rev Ing Biomédica. (2009)
3. Virginia Sáez, Estibaliz Hernáez, Lucio Sanz Angulo, Issa Katime, Liberación controlada de fármacos, micropartículas, Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 5(2), Julio de 2004
4. M.R. Aguilar, C. Elvira, A. Gallardo, B. Vazquez, and J.S. Roman. Smart polymers and their applications as biomater. Biomaterials cap.6
5. Yong Qiu, Kinam Park. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. Advanced drug delivery reviews (2001) 321-339
6. Julio C. Cuggino, Dra Cecilia Álvarez. Síntesis de hidrogeles para su posible aplicación en liberación controlada de fármacos. (2008)
7. Karl Kratz, Thomas Hellweg, Wolfgang Eimer, Influence of change density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels, Colloids and surfaces (2000) 137-149
8. M. ZrõAnyi, Intelligent polymer gels controlled by magnetic Colloid Polym Sci 278:98±103 (2000)
9. D.M.Garcia; J.L. Escobar; N. Bada y J. de D. Casquero. Estudio de transición critica a temperaturas bajas en hidrogeles termosensibles: Rev. Bioingeniería (2005)
10. Leopoldo Villafuerte Robles. Nanotecnología Farmacéutica.
11. Nicholas A. Peppas and William Leobandung, stimuli-sensitive hydrogels: ideal carriers for chronobiology and chronotherapy, J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 15, No. 2, pp. 125–144 (2004)
12. V. V. A. Fernandez, N. Tepale, J. C. Sanchez-Diaz, E. Mendizabal, J. E. Puig, J. F. A. Soltero, Thermoresponsive nanostructured poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels made via inverse microemulsion polymerization, Colloid Polym Sci (2006) 284: 387–395
13. G. Fu, W.O. Soboyejo, Swelling and diffusion characteristics of modified poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels Materials Science and Engineering C 30 (2010) 8–13
14. Judith Musch,[†] Stefanie Schneider,[†] Peter Lindner,[‡] and Walter Richtering*, Unperturbed Volume Transition of Thermosensitive Poly-(N-isopropylacrylamide) Microgel Particles Embedded in a Hydrogel Matrix *J. Phys. Chem. B* 2008, *112*, 6309–6314
15. Si-Xue Cheng, Jian-Tao Zhang, Ren-Xi Zhuo Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved protein release properties
16. Aniket S. Wadajkar Æ Bhanuprasanth Koppolu Maham Rahimi Kytai T. Nguyen, Cytotoxic evaluation of N-isopropylacrylamide monomers and temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanoparticles J Nanopart Res (2009) 11:1375–1382
17. Blanca Rojas, Marvelis Ramírez, Rocelis Aguilera. Los hidrogeles poliméricos como potenciales reservorios de agua y su aplicación en la germinación de semillas de omae en diferentes tipos de suelos. (2006)

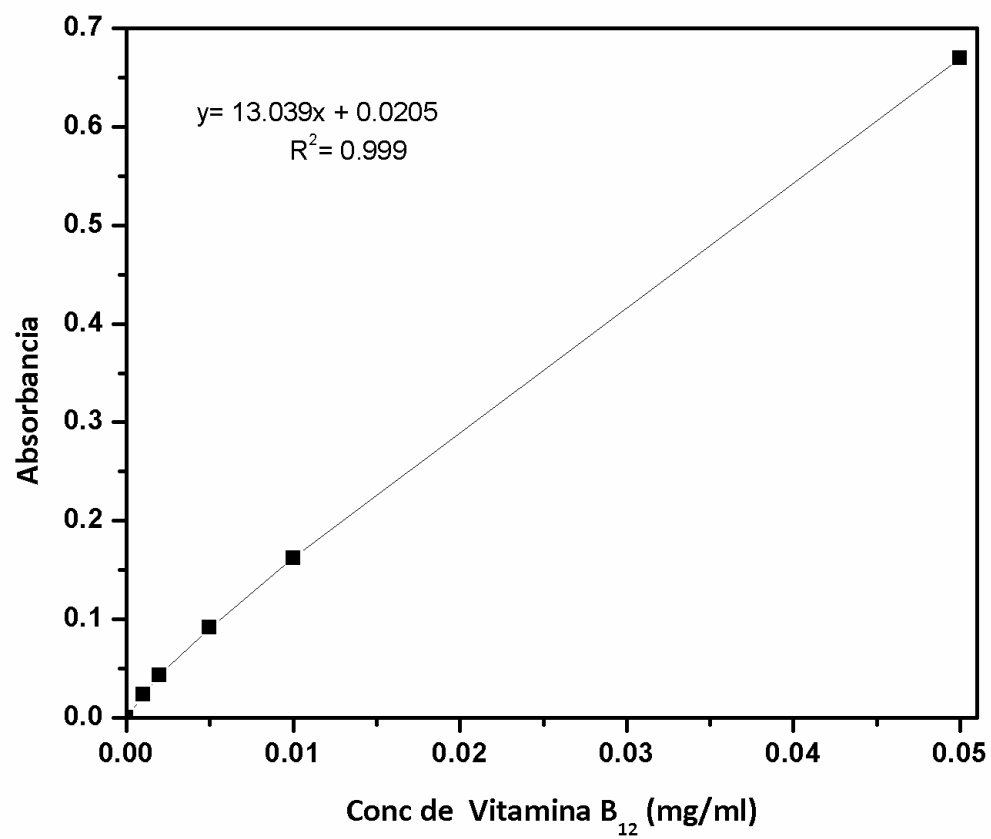
18. M. Carrillo, M. Vivas, L. Jiménez, L. Hernández. Síntesis de hidrogeles de poli(acido itaconico-co-metacrilato de metilo. Rev. Iberoamericana de polímeros (2009)
19. Si-Xue Chang, Jian-Tao Zhang, Ren-xi Zhuo. Macroporous poly(N-isopropilacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved proein release properties. (2003)
20. Kenia P, Tesis Geles microestructurados de N-isopropilacrilamida con rápida respuesta a la temperatura para liberación de macromoléculas, FCQI, UABC, 2012
21. Lura SerraBigas, Jose Domenech, Nicholas A peppas. Diseño y síntesis de hidrogeles acrílicos modificados para la liberación controlada de fármacos.
22. Jung Kwon Oh, Ray Drumright, Daniel J. Siegwart. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. (2008)
23. Ravi, M.N.V.; Domb, A.J. Drug delivery, controlled. En Wnek G.E.; Bowlin, G.L. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. 2ª ed. Estados Unidos: Informa Healthcare, 2008. pp.880-881
24. Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros, volumen 13 n°1 febrero 2005
25. Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada
26. Virginia Saez, Estibaliz, Leyre Lopez. Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones Biomédicas (2003)
27. I.C Rodrigues, Cerexo A. Salem. Sistemas de liberación Bioadhesivos.
28. Tarun Garg, Arsh Chanana, Ankit Gupta. Pulsatile drug delivery systems: pulsincap system Journal of pharmacy (2012)
29. Lisete Agüero, Dionisio Zaldivar, Jorge Luis Escobar. Liberación de cefalexina a partir de hidrogeles de poli(acrilamida-co-acido metacrilico) (2000)
30. Reynaldo León Almaraz, Mario Alberto Ramírez Cruz. Síntesis, caracterización y aplicación del PS entrecruzado a partir de residuos de PS Rev. Iberoamericana de polímeros (2007)
31. H. Iván Meléndez Ortiz 1, Guillermina Burillo 2, Emilio Bucio aplicaciones de la radiación gamma y UV para injerto molecular y el diseño de matrices para aplicaciones terapéuticas
32. Lev E. Bromberg Eyal S Ron, Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, Advanced drug delivery reviews 1998
33. Peppas, N.A. Hydrogels. En Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen F.J.; Lemons J.E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2ª ed. Estados Unidos: Academic Press, 2004. Secc. 2.5 pp.35
34. Park, k.; Shalaby, W.S.W.; Park, H. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. Estados Unidos: Technomic Publishing AG., 1993. pp.100
35. M.R.Aguilar, C.Elvira, A.Gallardo, B.Vazquez and J.S.Roman, Smart polymers and their applications as biomaterials chapter 6 Biomaterials
36. Jua Rueda, Stefan Zschoche, Hartmut Komber. Dirk Schmaljohann, Síntesis y caracterización de polímeros termosensibles

37. Tanaka, T. Phase transitions of gels. En Harland, R.S.; Prud, H. *Polyelectrolyte gels: properties, preparation and applications*. ACS Symposium series 480. Estados Unidos: American Chemical Society, 1992. Cap.1 pp.1-21
38. J.I Escobar, D. M. Garcia, A Valerino. Influencia de la temperatura y la composición de los copolímeros sobre el proceso de hinchamiento en hidrogeles de poli(N-isopropilacrilamida-co-N,N,dimetilacrilamida) (2003)
39. R. Langer, Peppas, N.A. *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology*. AIChE J. (2003) 49:2990-3006
40. Aurora Reillo Martin, Francisco Javier Nvarro Lupion, Pilar Bustamante Martínez. Estudio del hinchamiento de la hidroxipropilmetilcelulosa en función de la polaridad del disolvente. *Tecnología Farmacéutica* pag 160
41. Eduardo Rogel, Angel Licea Jose Manuel Cornejo. Preparación de hidrogeles anfífilos sensibles a diferentes valores de pH utilizando monómeros ácidos con espaciadores hidrofóbicos. (2003), *Journal of the mexican chemical society*, vol 47, pag 251-257
42. N Pinzón, Katime, I.; Espinosa, A.; Perilla, J.; Hernáez, E. Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en hidrogeles. *Rev. Iber. Polím.* (2002) 3:39-54
43. Issa A. Katime Amashta. Hidrogeles inteligentes
44. Espectroscopia ultravioleta/Visible, departamento de química física universidad de granada estructura de macromoléculas.
45. Ana Milena Valderrama F., Julia Raquel Acero R. Application of green fluorescent protein for monitoring phenol degrading strains *Revista colombiana de biotecnología*, Vol.III No.2

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

ANEXO 1



ANEXO 2

