



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“GELES MICROESTRUCTURADOS DE
N-isopropilacrilamida CON RÁPIDA RESPUESTA A LA
TEMPERATURA PARA LA LIBERACIÓN DE
MACROMOLÉCULAS”**

TESIS

Para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

Por

KENIA PALOMINO VIZCAINO

Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana B.C.

Junio de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Tijuana, Baja California
Mayo /12

C. KENIA PALOMINO VIZCAINO
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

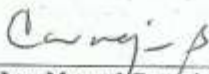
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la Opción TESIS

es propuesto por el **DR. JOSE MANUEL CORNEJO BRAVO** y **DRA. ARACELY SERRANO MEDINA**

quién será responsable de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema:
"Geles microestructurados de N-isopropilacrilamida con rápida respuesta a la temperatura para liberación de macromoléculas" el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSION DE RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA




Dr. Jose Manuel Cornejo Bravo
Asesor


Dra. Aracely Serrano Medina
Co-Asesor


Q. Noemi Hernández Hernández
Sub-Director


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

ÍNDICE

	Página
Índice	iv
Abreviaturas, acrónimos y simbología	vi
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Índice de ecuaciones	viii
CAPÍTULO I RESUMEN	1
CAPÍTULO II INTRODUCCIÓN	5
II.1. ANTECEDENTES	6
II.2. JUSTIFICACIÓN	8
II.3. OBJETIVO GENERAL	9
II.4. OBJETIVOS PARTICULARES	9
CAPÍTULO III TEORÍA GENERAL	10
III.1 SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	11
III.1.1. Conceptos básicos	11
III.1.2. Mecanismos de liberación controlada	12
III.2. POLÍMEROS INTELIGENTES: HIDROGELES	13
III.2.1. Polímeros	13
III.2.2. Hidrogeles	13
III.2.3. Polímeros inteligentes	15
III.2.3.1. Polímeros inteligentes sensibles a la temperatura	16
III.3. GRADO DE HINCHAMIENTO	18
III.3.1 Factores que afectan al hinchamiento	19
III.4. MICROPARTÍCULAS	19
III.5. <i>N</i> -ISOPROPILACRILAMIDA	20
III.5.1. NIPAAm	20
III.5.2. Geles de NIPAAm: materiales sensibles a la temperatura	20

CAPÍTULO IV	EXPERIMENTAL	22
IV.1.	EQUIPOS Y REACTIVOS	23
IV.2.	PURIFICACIÓN DE <i>N</i> -ISOPROPILACRILAMIDA	24
IV.3.	SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS	24
IV.4.	PREPARACIÓN DE GELES DE <i>N</i> -ISOPROPILACRILAMIDA	24
III.4.1.	Preparación de geles entre placas de vidrio	25
IV.5.	ESTUDIO DE HINCHAMIENTO RESPECTO A LA TEMPERATURA	28
IV.6.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO	28
IV.7.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE COLAPSO	29
IV.8.	ESTUDIO DE CINÉTICA HINCHAMIENTO/COLAPSO	30
IV.9.	ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS	30
IV.9.1.	Liberación de Vitamina B12	30
IV.9.1.1.	Cargado de geles con Vitamina B12	30
IV.9.1.2.	Estudio de liberación de Vitamina B12	31
IV.9.2.	Liberación de Citocromo C	33
IV.9.2.1.	Cargado de geles con Citocromo C	33
IV.9.2.2.	Estudio de liberación de Citocromo C	33
CAPÍTULO V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
V.1.	SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS	35
V.2.	PREPARACIÓN DE GELES DE <i>N</i> -ISOPROPILACRILAMIDA	36
V.2.1.	Geles de NIPAAm	36
V.3.	ANÁLISIS DEL GRADO DE HINCHAMIENTO	36
V.3.1.	Grado de hinchamiento	37
V.4.	ANÁLISIS DEL HINCHAMIENTO RESPECTO A LA TEMPERATURA	37
V.5.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO	40
V.6.	ESTUDIO DE CINÉTICA DE COLAPSO	41
V.7.	ESTUDIO DE CINÉTICA HINCHAMIENTO/COLAPSO	43
V.8.	ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS	45
V.8.1.	Evaluación de cinética de liberación de Vitamina B12	46
V.8.2.	Evaluación de cinética de liberación de Citocromo C	47
CAPÍTULO VI	CONCLUSIONES	50
CAPÍTULO VII	REFERENCIAS	53
CAPÍTULO VIII	ANEXOS	56

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIMBOLOGÍA

λ	Longitud de onda
APS	Persulfato de amonio
BIS	<i>N-N</i> -bisacrilamida
Cit C	Citocromo C
LCST	Temperatura critica inferior de disolución
M_t	Cantidad liberada de un fármaco a un tiempo t
M_∞	Cantidad total de fármaco en el gel
MP	Micropartículas
NIPAAm	<i>N</i> -isopropilacrilamida
Nm	Nanómetros
Q	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

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Página
1	Cinética de liberación pulsátil	12
2	Descripción esquemática de tipos de entrecruzamiento de geles	15
3	Representación de un gel inteligente al variar la temperatura	16
4	Representación esquemática del efecto térmico de un hidrogel que contiene fármaco	17
5	Representación esquemática del comportamiento reversible del gel hinchamiento/colapso	18
6	<i>N</i> -isopropilacrilamida	20
7	Representación de la formación de un gel	21
8	Reacción de polimerización de geles de NIPAAm	26
9	Representación esquemática de la preparación de geles entre placas de vidrio	27
10	Viales que contienen los discos de cada diferente gel	28
11	Sistema empleado para los estudios de liberación	32
12	Tamaño de partícula nm y temperatura de transición	35
13	Grado de hinchamiento de geles de NIPAAm a diferentes temperaturas	38
14	Derivada de la curva de Q vs T (Grafica 1) de geles NIPAAm a diferentes temperaturas	40
15	Grado de hinchamiento de geles de NIPAAm a diferentes tiempo a 25°C	41
16	Cinética de colapso de geles de NIPAAm a diferentes tiempos a 42°C	43
17	Cinetica de hinchamiento/colapso de los geles de NIPAAm con ciclos de temperatura de 25°C y 42°C	44
18	A) Gel NIPAAm, B) NIPAAm 7.5%MP, C) NIPAAm 15%MP, D) NIPAAm 15%MP 6%BIS, E) NIPAAm 30%MP, 1) gel seco, 2) hinchado a 25°C 3) colapsado a 42°C.	45
19	Cinética de liberación Vitamina B12 de los geles de NIPAAm variando la temperatura cada hora	47
20	Cinética de liberación Citocromo C de los geles de NIPAAm variando la temperatura cada hora	48

ÍNDICE DE TABLA

Fig.		Página
1	Porcentajes de micropartículas y entrecruzante en cada gel	25
2	Temperatura crítica de transición	39
3	Cantidad de fármaco cargado	49

LISTA DE ECUACIONES

No.		Página
1	Grado de hinchamiento	19
2	Derivada de Q	39
3	Fracción libre	46

*Porque sabiendo que no existirá forma alguna de agradecer,
una vida de sacrificios, esfuerzos y amor, quiero que sientan
que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la
fuerza que me ayudó a conseguirlos fue su gran apoyo.*

Por la confianza que me brindaron a los mejores padres

Rogelio y Martha Patricia

*Por siempre llevarme a los extremos, exigir lo mejor de mí,
por los consejos, sugerencias y regaños, por siempre pensar
en ser el mejor y no uno más, mi hermano*

Giovanni

*Por ser siempre el mejor amigo, confidente y compañero, por
tus consejos, ánimos y alegrías que me impulsaron a seguir
adelante por darme la felicidad y por entrar a mi vida y ser
una inspiración gracias .*

Héctor

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas especiales que me han brindado su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunos están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón.

Dr. José Manuel Cornejo Bravo por ser una inspiración a seguir, por demostrarme su confianza y brindarme su amistad, por ser un ejemplo a seguir y por impulsar mi interés en la el área de la investigación.

Dra. Aracely Serrano Medina, Karla, Víctor, Dalia, Claudia y Héctor compañeros y amigos del laboratorio de Biofarmacia que gracias a su apoyo, ayuda, consejos y enseñanzas me mostraron el camino de la investigación.

A mis amigos y compañeros de carrera que me acompañaron en esta bonita etapa de mi vida, y siempre me apoyaron.

Sin importar en donde estén solo quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por sus bendiciones.

Muchas gracias

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, bajo la dirección de los profesores:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

y

Dra. Aracely Serrano Medina

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

**“GELES MICROESTRUCTURADOS DE *N*-ISOPROPILACRILAMIDA CON RÁPIDA
RESPUESTA A LA TEMPERATURA PARA LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS”**

Por

Kenia Palomino Vizcaíno

Para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo bravo

El presente trabajo de investigación incluye la preparación de geles de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm). Se eligió este monómero 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 un cambio en el volumen. Con este tipo de geles se pretende la liberación controlada por medio de pulsos. Esta teoría se basa en mejorar la resistencia del gel y evitar que los poros del gel se cierren ya que bloquearía el transporte de agua y solutos, por ello se propone mejorar los geles anteriormente estudiados, haciendo que sean más porosos mediante la incorporación de micropartículas de NIPAAm, con esto, los geles mantendrán sus poros debido a que las micropartículas se

entrecruzan y forman parte de la red al momento de la polimerización, y esto nos lleva a que al colapsar estos formen los poros y además contribuyen a que sean más resistentes.

Una vez identificado el problema y propuesta la solución, se procedió a la formulación de los geles. Se realizaron diferentes formulaciones variando los porcentajes de micropartículas y porcentaje de entrecruzante. Se prepararon con 3% de entrecruzante a los cuales se les varió el porcentaje de micropartículas de NIPAAm (0, 7.5, 15 y 30%), además uno de los geles contenía 15%MP y 6% Bisacrilamida como entrecruzante, 1% de APS como iniciador y 1% de TEMED como catalizador.

Una vez concluido se procedió a estudiar el comportamiento de hinchamiento con respecto a temperatura, se obtuvo que la temperatura de transición de los geles se mantiene en 32-33°C, se determinó el grado de hinchamiento (Q) en diferentes circunstancias, estas son la cinética de hinchamiento, colapso, hinchamiento/colapso, los cuales se realizaron en agua y se logro verificar la capacidad de cada gel de absorber el disolvente, siendo el de 30%MP el que tiene una mayor capacidad de hinchamiento y el de 15%MP 6%BIS el que tiene una menor capacidad, los geles que contienen 15%MP Y 30%MP colapsan rápidamente en menos de 10 min, y mantienen una cinética reproducible.

Con estos geles se realizaron liberaciones con Vit B12 y Citocromo C los cuales se liberaron por medio de ciclos de temperatura de 25°C a 42°C, estos nos muestran que estos geles de NIPAAm solo liberan cuando esta hinchado el gel, y por lo contrario los geles con micropartículas nos muestra que libera una pequeña cantidad hinchado pero al momento de colapsar libera en su totalidad.

Por ello se puede decir que las micropartículas nos sirven como punto de entrecruzamiento para producir materiales microporosos con buenas propiedades mecánicas.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. ANTECEDENTES

En los últimos 30 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. Mediante el desarrollo de sistemas de liberación innovadores, diseñados a partir de materiales inteligentes, capaces de responder a diferentes reacciones fisiológicas⁽⁶⁾ liberando su carga en el lugar, tiempo y la velocidad deseada.⁽²⁾

Los poliméricos inteligentes, son llamados de esta forma ya que responden a ligeros cambios en su entorno, como temperatura, pH, luz, campo eléctrico, moléculas biológicas, etc., sufriendo cambios drásticos en sus propiedades.⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾ 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.⁽¹⁾ El interés en desarrollar polímeros inteligentes se ha incrementado para con ellos poder desarrollar sistemas de liberación de fármacos con direccionamiento o localización específica.⁽⁷⁾

Uno de los materiales más estudiados es la NIPAAm, que es sensible a la temperatura, este polímero sufre una transición de hinchamiento a colapso a una temperatura crítica de 32-33°C.⁽⁸⁾⁽⁹⁾

A los geles de NIPAAm se les ha atribuido la capacidad para absorber grandes cantidades de agua o soluciones acuosas, convirtiéndolo en ese momento en hidrogel.⁽¹⁰⁾ El mecanismo por el cual los polímeros son capaces de absorber tanto volumen de

soluciones acuosas no es solamente físico, también depende de la naturaleza química del polímero así como de la respuesta elástica de entrecruzamiento.⁽¹¹⁾

Debido a la propiedad que presentan de absorber agua, los convierte en materiales de gran interés en el área biomédica para ser aplicados como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos, dispositivos para diagnóstico, sustrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, membranas para hemodiálisis, sistemas terapéuticos biodegradables, lentes de contacto e implantes.⁽¹⁰⁾

La NIPAAm se ha estudiado con anterioridad y está documentado que los geles de este material presentan características importantes, pero, al mismo tiempo se sabe que no es un buen material para ser aplicado de manera independiente como vehículo farmacéutico para un sistema de liberación, ya que se colapsan a una temperatura superior a su T_{tr} formando una piel en el exterior la cual bloquea la salida del disolvente. Este problema atrajo interés en investigar y mejorar estos geles de NIPAAm. En una investigación se propuso la incorporación de sales inorgánicas con la intención de formar macroporos en el gel, los cuales evitarían la formación de la piel y con ello el bloqueo de la liberación, en estos se observó una pequeña liberación pero surgiendo el mismo problema ya que los poros formados se cierran a altas temperaturas, lo cual causa un bloqueo que lleva al mismo problema de liberación.⁽⁹⁾ Por lo anterior, es importante continuar con la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para lograr obtener un sistema de liberación con las características deseadas.

II.2. JUSTIFICACIÓN

En la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, en el área de Biofarmacia, actualmente se realizan trabajos de investigación de síntesis de monómeros para el desarrollo de vehículos farmacéuticos a partir de polímeros sensibles a la temperatura. Estos con el fin de aplicarlos como sistemas de liberación pulsátil.

La propuesta se basa en mejorar la formulación de los geles de *N*-isopropilacrilamida. Esto pretende lograr geles microestructurados de NIPAAm, mediante la incorporación de diferentes proporciones de micropartículas de NIPAAm, ya que se comportaran en forma de poro y con esto evitar el bloqueo en la liberación. Esto evitara la formación de una piel en el exterior del gel que ha sido reportada con anterioridad.

Con todas las aplicaciones que se han encontrado a estos materiales y con el principal interés de proponer un sistema de liberación de fármacos por medio de pulsos, los cuales puedan ser capaces de liberar macromoléculas, esto impulsa a realizar esta mejora en los geles de NIPAAm ya que en la actualidad es un problema muy importante la liberación de proteínas para el ámbito medico.

II.3. OBJETIVOS GENERALES

Desarrollar un sistema de liberación pulsátil microestructurado sensible a la temperatura con rápida respuesta.

II.4. OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Preparar hidrogeles con diferentes porcentajes de micropartículas de NIPAAm.
- b. Estudiar el grado de hinchamiento con respecto a la temperatura y determinar la temperatura de transición.
- c. Estudiar las cinéticas de hinchamiento, colapso e hinchamiento/colapso de los geles con respecto al tiempo.
- d. Cargado de los geles con macromoléculas de diferente peso molecular y estudiar la cinética de liberación con ciclos de temperaturas.

CAPÍTULO III
TEORÍA GENERAL

III.1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

III.1.1. Conceptos básicos

En las últimas 3 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,⁽¹²⁾ esto ha sido impulsado por áreas como química de polímeros, biotecnología, nanotecnología, entre otras.⁽¹³⁾

El éxito de estos sistemas de liberación controlada, se basa en los beneficios económicos y terapéuticos que ofrecen, principalmente por la miniaturización de los dispositivos, el control de tiempo de liberación y ubicación de los sistemas en lugares específicos en el organismo.⁽¹⁴⁾

Sistema de liberación controlada.- Este se relaciona con otros términos como liberación prolongada, liberación sostenida, sistemas dirigidos, entre otros. Estos 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, la cual busca que la concentración del fármaco se mantenga constante en el organismo.⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Sistema de liberación pulsátil.- Esta también llamada liberación por pulsos, o secuencial, tiene como objetivo principal 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,⁽¹⁵⁾ al igual que la liberación de proteínas, las cuales tienen que ser adecuadas para la administración de la biomolécula intacta.⁽¹⁸⁾

Algunos ejemplos de los fármacos que en la actualidad existen por medio de liberación pulsátil son Pulsincap®, Ritalin®, and Pulsys®.⁽¹⁵⁾⁽¹⁹⁾ En la **Figura 1** se observa un esquema de la cinética de liberación pulsátil.



Figura 1. 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.⁽²⁰⁾

III.1.2. Mecanismos de liberación controlada

El desarrollo de dispositivos de liberación controlada de fármacos, implica un campo importante del avance moderno en el área farmacéutica. El incentivo principal de

estos sistemas, es la mejora en la eficacia del tratamiento terapéutico y el diseño de formas de dosificación prácticas para el paciente.

III.2. POLÍMEROS INTELIGENTES: POLÍMEROS RETICULADOS O HIDROGELES

III.2.1. Polímeros

Un polímero es una gran molécula constituida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples. En algunos casos la repetición es lineal, de forma semejante a como una cadena la forma sus eslabones. En otros casos las cadenas son 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.⁽²¹⁾

III.2.1. Hidrogeles

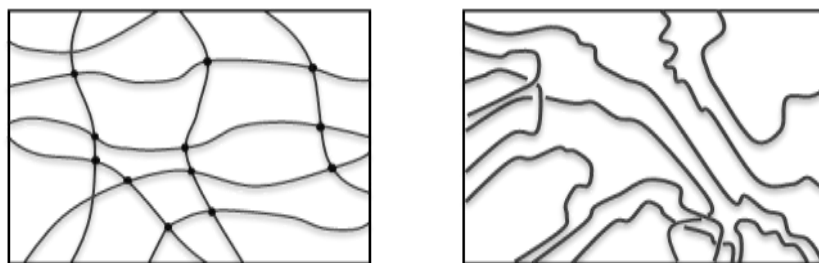
Un gel o hidrogeles es una red polimérica la cual tiene la propiedad de absorber grandes cantidades de solvente, sin disolverse⁽²²⁾ y lo que provoca cambios macroscópicos en las dimensiones del polímero pero manteniendo su forma.⁽²³⁾ La red tridimensional es estabilizada por agentes entrecruzantes el cual puede presentar enlaces covalentes, enlaces de puente de hidrogeno, enlaces de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas.⁽²⁴⁾

Un gel es una estructura polimérica tridimensional, que se mantiene unida por enlaces químicos y/o físicos. En la red, existe un espacio intersticial en el cual moléculas de agua, fluido biológico y disolvente orgánico pueden ser atrapadas llenando el volumen libre disponible sin disolverse y conservando su forma como resultado de un balance entre fuerzas intermoleculares.⁽²⁵⁾

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.⁽²⁶⁾

a) Geles entrecruzados químicamente.- Son redes tridimensionales entrecruzadas covalentemente. Este tipo de geles no pueden disolverse en agua o cualquier otro tipo de disolvente, incluso calentándolos (**Figura 2a**).⁽²⁶⁾

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 (**Figura 2b**).⁽²⁶⁾



a) Gel entrecruzado químicamente b) Gel entrecruzado físicamente

Figura 2. Descripción esquemática de tipos de entrecruzamiento de geles.

Los geles pueden clasificarse en grupos dependiendo de las características y propiedades particulares que se tomen como referencia.

Se pueden clasificar dependiendo del método de preparación en: a) geles homopoliméricos b) geles copoliméricos c) geles multipoliméricos y d) redes poliméricas interpenetradas.⁽²⁷⁾

III.2.3 POLÍMEROS INTELIGENTES

Los polímeros inteligentes son aquellos que responden a cambios en una propiedad a pequeños estímulos físicos o químicos. Estos polímeros pueden estar en varias formas, tales como en solución, en superficies o como sólidos. Existen diversos estímulos que pueden ser aplicados: temperatura, pH, iones, campo eléctrico, disolventes, entre otros (**Figura 3**).⁽⁷⁾⁽²⁸⁾⁽³⁵⁾

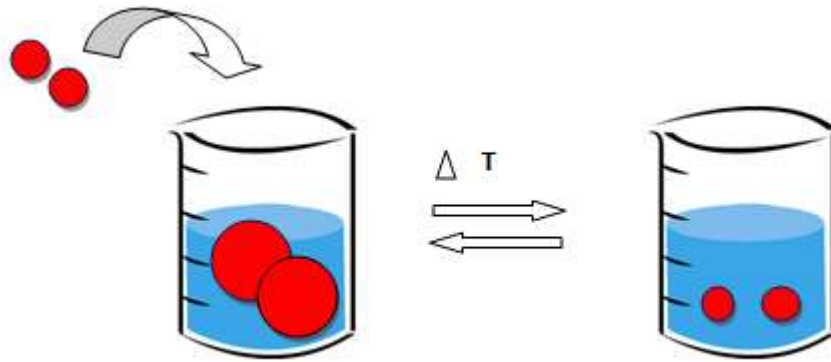


Figura 3. Representación gráfica de un gel inteligente al variar la temperatura

III.2.3.1 Polímeros inteligentes sensibles a temperatura.- Existen variedades de polímeros que exhiben una transición de fase en respuesta a un cambio de temperatura, por lo que se dice que son sensibles a esta. Se ha visto que la variación de este parámetro provoca en el material cambios estructurales interesantes, fundamentalmente para su aplicación en biomedicina.

Se ha observado que las transiciones de fase en hidrogeles dependen de la temperatura, las cuales se manifiestan en grandes cambios de volumen. Este comportamiento puede ser regulado mediante un adecuado control de las fuerzas hidrófobas e hidrófilas.⁽²⁹⁾

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 4**).

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.⁽³⁰⁾

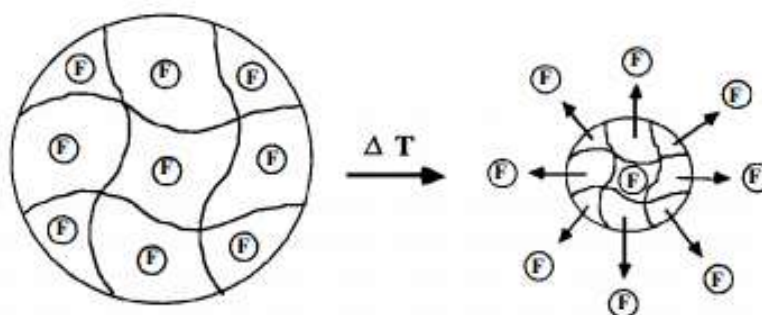


Figura 4. Representación esquemática del efecto térmico de un hidrogel que contiene fármaco.

Una característica interesante de muchos geles sensibles a estos estímulos es que el mecanismo que causa el cambio estructural es completamente reversible (**Figura 5**).⁽³¹⁾

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.⁽²⁴⁾

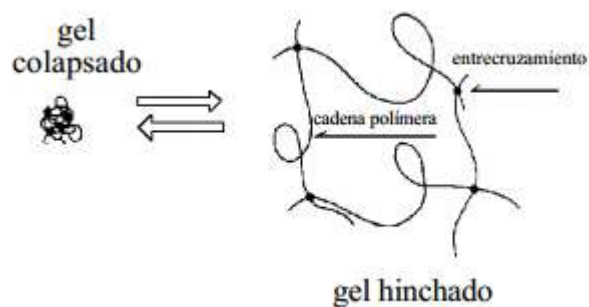


Figura 5. Representación esquemática del comportamiento reversible del gel (hinchamiento/colapso).

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.⁽³²⁾

III.3. Grado de hinchamiento (Q)

El hinchamiento puede definirse en términos de velocidad y de equilibrio de máxima imbibición, y define la capacidad de penetración de las moléculas del disolvente en el polímero, dependiendo del grado de entrecruzamiento del polímero, de su naturaleza y de la naturaleza del disolvente, entre otros factores.⁽³³⁾

Cuantificación del grado de hinchamiento.- La cantidad de líquido (agua, fluido biológico, disolventes orgánicos) que logre atrapar el gel en su matriz polimérica se conoce como grado de hinchamiento **Ecuación 1.**⁽³⁴⁾

El grado de hinchamiento se determina por la siguiente ecuación la cual se representa el peso húmedo (W_h) y el peso del gel seco (W_s):

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

III.3.1. Factores que afectan al hinchamiento

Un parámetro que afecta el hinchamiento es la cantidad de entrecruzante, que no solo es debido a uniones covalentes, también a fuerzas intermoleculares como las de Van der Waals y puentes hidrógeno, así como a interacciones iónicas e hidrofóbicas.⁽³¹⁾ También interviene la fuerza iónica, debido a que las sales disueltas protegen a los grupos ionizados del gel, disminuyendo la ionización efectiva del polímero.⁽³⁵⁾

III.4. Micropartículas

La eficacia de la administración de fármacos 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. Este grado de interacción y asimilación por parte del 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.⁽²⁹⁾

III.5. *N*-ISOPROPILACRILAMIDA

III.3.1. NIPAAm

Históricamente, las primeras publicaciones relacionadas con la *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) **Figura 6** tratan sobre la síntesis y polimerización de este monómero. Esta se ha empleado en muchas formas, las cuales incluyen cadenas sencillas, geles macroscópicos, microgeles, latex, películas delgadas, membranas, fibras, entre otras.

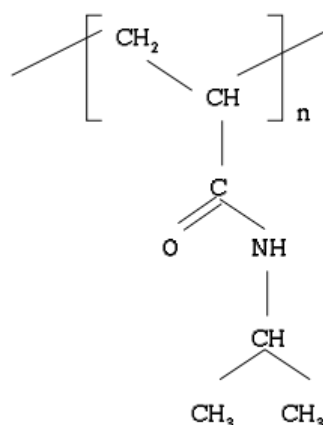


Figura 6. *N*-isopropilacrilamida

III.3.2. GELES DE NIPAAm: materiales sensibles a la temperatura

Los geles son redes entrecruzadas de polímeros, hinchadas con un líquido **Figura 7**. 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.

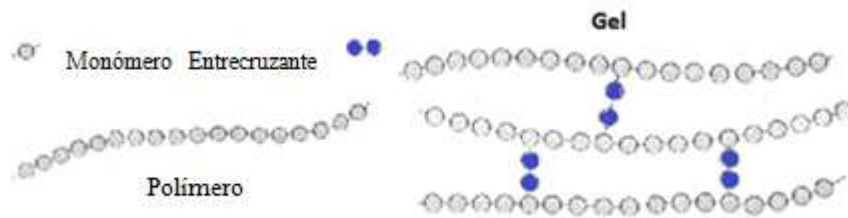


Figura 7. Representación de la formación de un gel

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. De esta manera, es posible remover selectivamente y liberar solutos 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*.

CAPÍTULO IV

EXPERIMENTAL

IV.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

a. Equipos

1. Agitador magnético VWR Dyla-Dual
2. Balanza analítica Denver Instrument M-200
3. Recirculador de agua con temperatura controlada, Cole-Parmer Polystat
4. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter DU 520, Single Cell module
5. Medidor de pH Corning Scholar

b. Reactivos, Disolventes y Gases

1. *N*-isopropilacrilamida
2. *N-N*-bisacrilamida
3. Persulfato de amonio
4. Tetrametilendiamina
5. Vitamina B12
6. Citocromo C
7. Hexano
8. Tolueno
9. Diclorodimetilsilano
10. Amortiguador de fosfatos pH 7.4
11. Nitrógeno grado alta pureza (INFRA S.A. de C.V.)

IV.2. PURIFICACIÓN DE *N*-ISOPROPILACRILAMIDA

El monómero de NIPAAm se recibe con un inhibidor de la polimerización el cual es necesario remover, La NIPAAm se purificó con hexano (25g NIPAAm/200mL hexano), utilizando baño a 45°C y agitación constante hasta que la mezcla fue homogénea, posteriormente se dejó enfriar, Una vez cristalizado el contenido se filtro a vacio, realizando lavados con hexano frio obteniendo la NIPAAm purificada.

IV.3. SÍNTESIS DE MICROPARTICULAS DE NIPAAm

La síntesis de micropartículas se realizó una solución que contiene 1% w/w de NIPAAm en agua esta mezcla se mantiene en agitación constante la solución se eliminó el oxígeno por medio de burbujeo con nitrógeno por 30 minutos, posteriormente se agregó el entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol 5% molar y el iniciador persulfato de amonio al 2% w/w se calentó a 80°C por 45 minutos y se retira y se coloca en frio para detener la reacción. 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 para obtener las micropartículas.

IV.4 PREPARACIÓN DE GELES DE *N*-ISOPROPILACRILAMIDA

Se prepararon geles termosensibles a partir de NIPAAm mediante polimerización en disolución vía radicales libres. Estos fueron elaborados en forma de lámina delgada entre dos placas de vidrio con un espaciador de silicona de 1mm.

Se utilizó NIPAAm como monómero, como disolvente se utilizó agua destilada. Se utilizó *N-N*-metilenbisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante, este producto directo de cómo fue entregado del proveedor.

Como iniciador se empleó persulfato de amonio (APS) este directo del producto de proveedor solo se realizó una disolución al 1% molar.

Otro compuesto importante es el tetrametilenediamina (TEMED) utilizado como catalizador de la reacción y utilizado en una disolución al 1% molar.

Las placas de vidrio utilizadas en la preparación de los geles, fueron previamente silinizadas por inmersión en una disolución 2% v/v de diclorodimetilsilano en tolueno durante cinco minutos. Después se enjuagaron con tolueno y fueron secadas a temperatura ambiente.

IV.4.1. Preparación de geles entre placas de vidrio

Se prepararon diferentes geles a partir del monómero de *N*-isopropilacrilamida al cual se sustituirán diferentes proporciones de la NIPAAm por el porcentaje en micropartículas siendo estos 0%, 7.5%, 15% y 30% utilizando 3% de entrecruzante, el quinto gel conteniendo 15% de micropartículas y 6% de entrecruzante.

Tabla 1. Porcentajes de los diferentes geles de NIPAAm.

Gel	NIPAAm 1	NIPAAm 2	NIPAAm 3	NIPAAm 4	NIPAAm 5
% micropartículas (n/ml)	0	7.5	15	15	30
% Bis molar	3	3	3	6	3

En todos los casos se utilizó 1% molar de APS, 1% TEMED en base a los moles del monómero según el caso y variando los porcentajes de micropartículas Figura 8.

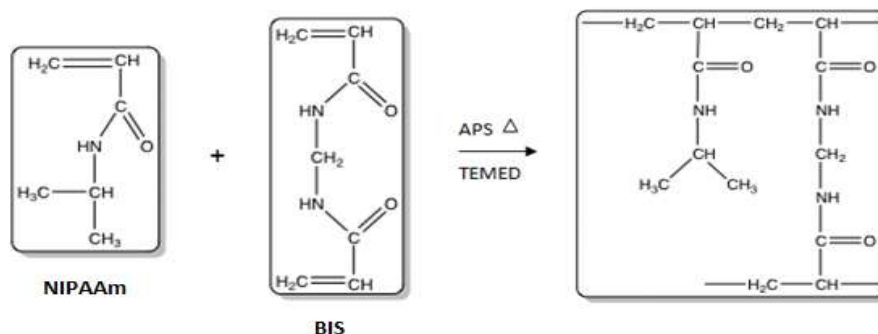


Figura 8. Reacción de polimerización de geles de NIPAAm

A continuación se explica el método de preparación del gel de NIPAAm, dado que todos los geles fueron realizados de la misma manera solo se explicará uno y los cambios en los demás serán explicados.

El primer paso de este procedimiento es colocar los moldes de placa de vidrio en un baño de hielo para mejorar este proceso, una vez hechos los cálculos necesarios se coloca en un matraz bola 1.588g de NIPAAm, 0.07g de BIS, y 8 ml de agua destilada, todo esto se mantiene en agitación constante por 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se coloca 1.0 ml de APS durante 1 minuto continuando con la agitación, y por último se coloca 1.0 ml de la solución de TEMED y se mantiene la agitación por 1 minuto más para con esto concluir la preparación procediendo a la colocación de esta en el molde que se encontraba en baño de hielo.

Por otro lado en el molde se colocó un espaciador de hule de silicona de 1 mm de diámetro, entre las dos placas de vidrio de 10 x 10 cm ensambladas con pinzas de metal. Utilizando una jeringa 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 9**).

Concluido ese tiempo, se extrajo la lámina de gel y se colocó en un recipiente con agua para lograr su purificación, la cual provoca que se elimine cualquier resto de material esto se realiza 1 vez al día por 7 días.

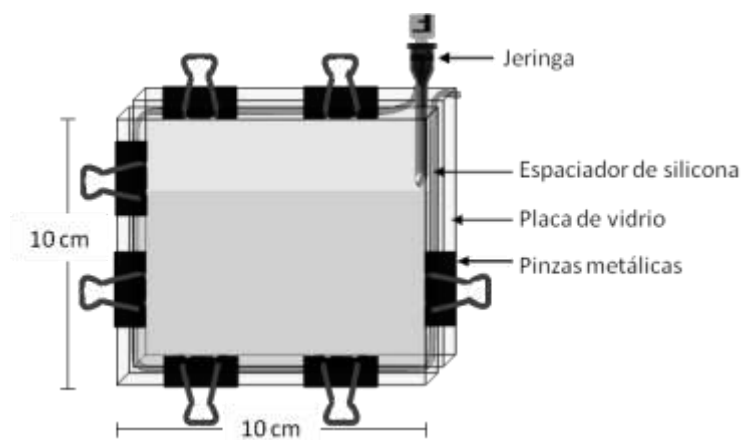


Figura 9. Representación esquemática de la preparación de geles entre placas de vidrio.

Una vez transcurrido el tiempo se procede a cortar el gel en pequeños discos de 1cm de diámetro con un orador (**Figura 10**). Todos estos geles se realizaron por 4 para dos de ellos convertirlos en discos y dejando otros 2 geles intactos para su investigación de resistencia mecánica.



Figura 10. Viales que contienen los discos de cada diferente gel.

IV.5. ESTUDIO DEL HINCHAMIENTO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA

Este estudio se realizó con el propósito de conocer el comportamiento del gel modificando la temperatura y determinar la temperatura crítica de transición de los geles anteriormente preparados, este se inicia pesando cada uno de los 5 diferentes geles el cual será su peso seco. Posteriormente se colocan en diferentes vasos con 5 ml de agua destilada cada uno, en el baño de agua anteriormente encendido a una temperatura inicial de 40°C.

Una vez que trascurrió el tiempo necesario para que el gel se hinchara hasta su equilibrio, se comenzó a descender la temperatura paulatinamente de 38°C hasta llegar a 20°C, respetando el tiempo de equilibrio y se procede a pesar cada gel en cada intervalo de temperatura.

IV.6. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO

Este estudio es con la finalidad de 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 estar pesando el gel a determinados tiempos 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 y 1440 minutos.

Este procedimiento debe ser muy cuidadoso al momento de extraer los geles para ser pesados ya que se debe hacer lo más rápido posible y eliminando el agua excedente de cada gel.

Con los datos adquiridos se determinó 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.7. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE COLAPSO

Este se realiza pesando el gel en seco y por duplicado, para poder determinar esta 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 con agitación constante una vez colocados se pesaron a los siguientes tiempo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 minutos, transcurrido el tiempo y con los pesos se calculó el grado de hinchamiento que nos mostró la cinética de colapso de estos geles.

IV.8. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO/COLAPSO

Estos se realizan en dos temperaturas una de 25°C y 42°C por debajo y arriba de la temperatura de transición reportada del polímero. Los geles se pesaron en seco y se colocan 24 horas en agua destilada para que se encuentre en equilibrio, esto se realiza en dos recirculadores de agua con temperatura controlada 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, esto durante las 7 horas de muestreo.

Una vez terminados estos experimentos se procedió a obtener el grado de hinchamiento de cada uno de los geles, lo cual nos dio la cinética de hinchamiento y el colapso del gel.

IV.9. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron a los 5 geles preparados por duplicado, utilizando Vitamina B12 y Citocromo C, estos fueron elegidos por su bajo peso molecular y son coloridos facilitando su cuantificación en el Espectrofotómetro UV/Vis. La cinética de liberación se efectuó en disoluciones amortiguadora de fosfatos a pH 7.4.

IV.9.1. Liberación de Vit B12

IV.9.1. 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 una solución de vitamina B12 la cual contenía 10mg/ml, estos

son colocados en el refrigerador por un periodo de 7 días para asegurar que se ha hinchado y atrapado la máxima cantidad.

IV.9.1.2. 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 **Figura 11**.

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.



Figura 11. Sistema empleado para los estudios de liberación.

Una vez terminado se procede a la lectura de las muestras tomadas en el espectrofotometro Uv-Vis a $\lambda=361$ nm. Esto se realiza un gel a la vez y por duplicado para los 5 diferentes y se procedió a su comparación.

IV.9.2 Liberación de Citocromo C

IV.9.2.1. 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 por un periodo de 7 días.

IV.9.2.2. 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 $\lambda=528$ nm.

La metodología para los experimentos de liberación se realizó de la misma manera que la liberación de Vitamina B12, se tomaron las mismas alícuotas etas siendo leídas a 528nm. Esto se realizó un gel a la vez y por duplicado para los 5 diferentes y fueron comparados.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS DE NIPAAAM

Se obtuvieron micropartículas de NIPAAm las cuales fueron estudiadas por medio de dispersión de luz dinámica, en el equipo Zetasizer la cual nos muestra un tamaño de partícula de cerca de 600nm **Figura 12(a)** y se obtuvo una temperatura de transición de 32°C **Figura 12(b)**.

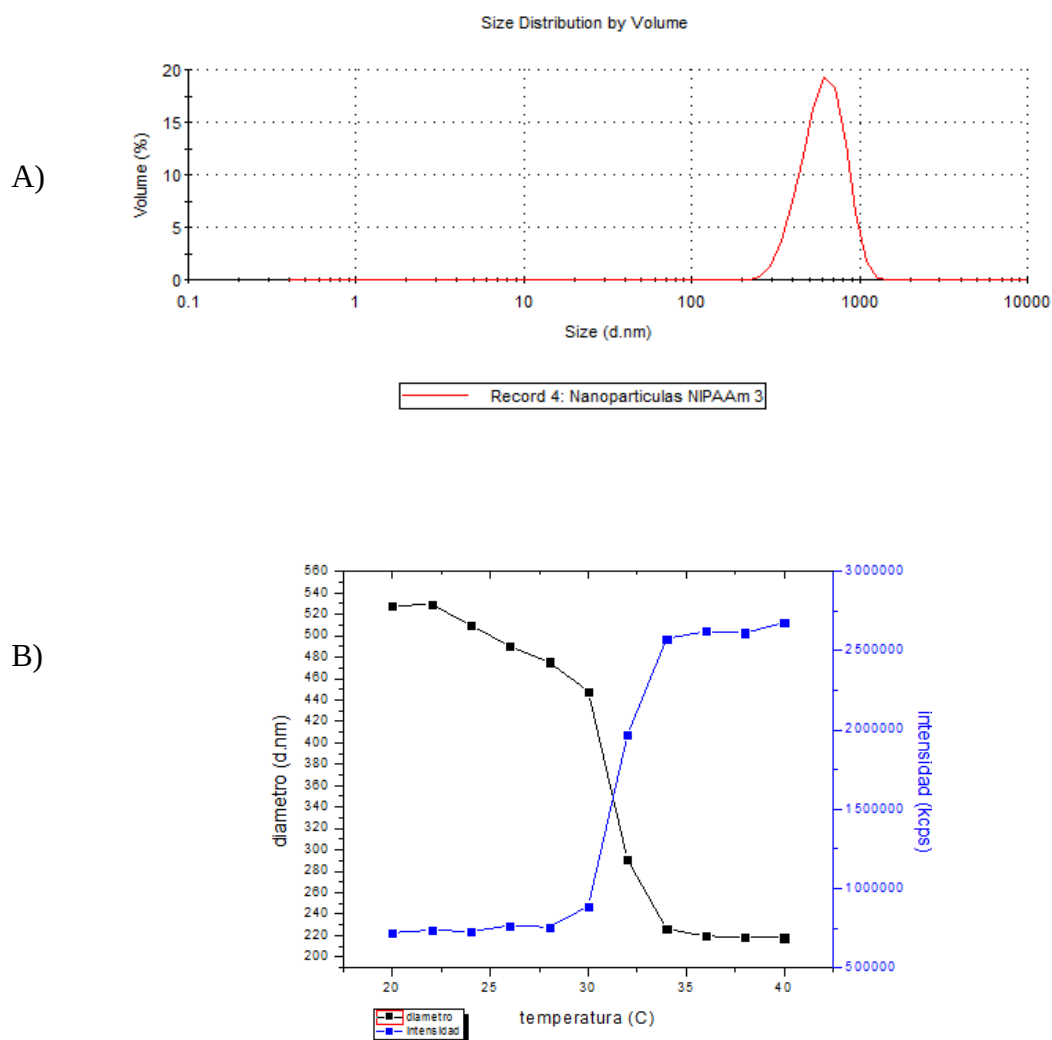


Figura 12. A) Tamaño de partícula nm B) Temperatura de transición de la micropartículas

V.2 PREPARACIÓN DE GELES DE *N*-ISOPROPILACRILAMIDA

V.2.1. Geles de *N*-isopropilacrilamida

Se prepararon geles termosensibles a partir del monómero *N*-Isopropilacrilamida, utilizando *N*-*N*-metilenbisacrilamida como agente entrecruzante con diferentes porcentajes de micropartículas de NIPAAm, los cuales se indican en la **Tabla 1**, esto mediante el método de polimerización vía radicales libres.

Tabla 1. Porcentajes de micropartículas y entrecruzante en cada gel.

Gel	NIPAAm 1	NIPAAm 2	NIPAAm 3	NIPAAm 4	NIPAAm 5
% micropartículas (n/ml)	0	7.5	15	15	30
% Bis molar	3	3	3	6	3

Se elaboraron 4 geles de cada porcentaje de micropartículas, dos de ellos para ser evaluada su resistencia mecánica, los geles restantes fueron cortados en discos de 1 cm de diámetro usando un horador, todos los geles obtenidos se observaban transparentes, solo los geles que contenían 15% NP se contenía un punto blanco en el centro el cual se refiere a cierta cantidad de humedad que se quedo dentro del gel.

V.3. ANÁLISIS DEL GRADO DE HINCHAMIENTO

Todos los experimentos realizados se tienen como único o principal cálculo el grado de hinchamiento, esto debido a que estos geles muestran la capacidad de

responder a cambios en su ambiente externo específicamente la temperatura, lo cual los convierte en geles inteligentes.

V.3.1 Grado de hinchamiento de los geles de NIPAAm

Se llevaron a cabo experimentos de hinchamiento de todos los geles, estos por duplicado. El análisis del grado de hinchamiento se determinó gravimétricamente en base al agua absorbida, expresado como porcentaje en peso de acuerdo a la Ecuación 1.

V.4. ANÁLISIS 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 observar la temperatura crítica de transición la cual se observa cuando ocurre un cambio drástico en el gel que pasa de estar hinchado a colapsarse de forma drástica.

En la **Figura 13** se muestran los resultados de Q con respecto a la variación de temperatura, en los cuales se observan los cambios desde 20°C a 40°C, estos cambios se realizaron respetando el tiempo de equilibrio del gel en cada punto de temperatura.

Todos los geles presentaron el mayor grado de hinchamiento en la temperatura de 20°C el cual disminuye de manera continua al aumentar la temperatura hasta que se presenta una disminución abrupta (discontinua) en la temperatura de transición.

Este estudio nos da otros datos que nos ayudan a entender mejor el comportamiento de los geles, esto con respecto a los diferentes grados de hinchamiento y básicamente en el máximo que estos alcanzan, como se puede observar en la **Figura 13**

que los geles de NIPAAm 0%, 7.5% de micropartículas se comportan de igual manera sin existir diferencia significativa, el gel con 15%MP se observa una pequeña diferencia a los dos anteriores pero esta sigue sin ser muy marcada.

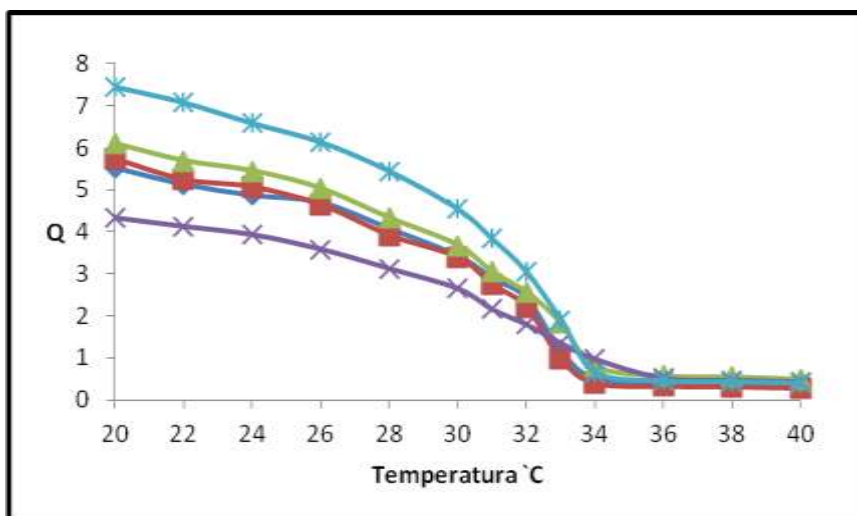


Figura 13. Grado de hinchamiento de geles de NIPAAm (●), NIPAAm 7.5%MP (■), NIPAAm 15%MP (▲), NIPAAm 15%MP 6%BIS (×), NIPAAm 30%MP (*), a diferentes temperaturas.

Sin embargo, en el gel que contiene 30%MP se observa como su grado de hinchamiento aumenta considerablemente, esto se lo podemos atribuir a que este contiene una mayor cantidad de micropartículas, las cuales hacen más poroso el gel lo cual causa que una mayor cantidad de agua penetre en esta red aumentando con esto su capacidad de hinchamiento, por último tenemos el gel de 15%MP 6%BIS, en este gel se determina un grado de hinchamiento por debajo de todos los anteriores lo cual nos muestra que el grado de entrecruzamiento de un gel determinará sus propiedades de hinchamiento, esto es a causa de que la red está más densa y por lo tanto, la cantidad de disolvente que puede entrar es menor.

Con estos datos obtenidos se pretende corroborar la temperatura de transición de los geles, se espera que la transición de todos estos geles de NIPAAm se mantenga cerca o igual a la temperatura que han reportado de 32°C a 33°C⁽⁵⁾, este comportamiento se determina realizando la derivada de cada punto con respecto a la temperatura **Ecuación 2** lo cual nos da como resultado que los geles de NIPAAm (0%, 7.5 y 15%6%) tienen una temperatura de transición de 32°C, mientras que los geles de NIPAAm (15% y 30%) su temperatura de transición se recorre un grado a 33°C **Tabla 2**, esto nos muestra que el gel no modifica su temperatura de transición lo cual se representa en la **Figura 14**.

Ecuación 2

$$\frac{dQ}{dt}$$

Tabla 2. Temperatura de crítica de transición

Geles de NIPAAm	NIPAAm	NIPAAm 7.5%MP	NIPAAm 15%MP	NIPAAm 15%MP 6%BIS	NIPAAm 30%MP
LCST	32°C	32°C	33°C	32°C	33°C

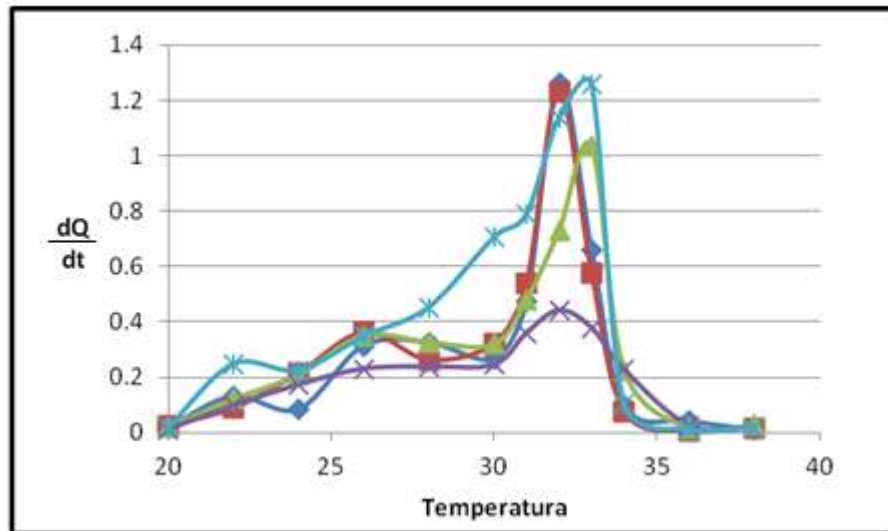


Figura 14. Derivada de la curva de Q vs T (Grafica 1) de geles de NIPAAm (◆), NIPAAm 7.5%MP (■), NIPAAm 15%MP (▲), NIPAAm 15%MP 6%BIS (×), NIPAAm 30%MP (✱), a diferentes temperaturas.

V.5. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO

Este estudio nos muestra como los geles se hinchan con el paso del tiempo, esto lo observamos en la **Figura 15**, la cual nos muestra los datos graficados mediante Q, con esta gráfica nos indica que los geles se comportan de la misma manera, sin embargo se observa que el gel con mayor capacidad de hinchamiento es el gel de NIPAAm 30%MP con una Q por encima de 5.6 indicando que el gel se hincha 5 veces más que el gel seco, el gel que continua en forma descendente es el de NIPAAm 15%MP el cual se ve que alcanza una Q de 5, continuando con los geles de NIPAAm y NIPAAm 7.5%MP los cuales tienen un comportamiento prácticamente igual manteniendo una Q cerca de 4.5 por lo cual no existe un comportamiento diferente entre estos dos geles.

Mientras tanto el gel de NIPAAm 15%MP 6%BIS se comporta de manera diferente con respecto al grado de hinchamiento que tiene con respecto al resto, ya que solo alcanza un Q de 3.4 lo cual nos demuestra que es el gel que tiene una menor capacidad de hinchamiento esto es debido a que contiene una mayor cantidad de entrecruzante y por lo tanto una menor capacidad de estirarse para dejar entrar el disolvente y poder hincharse.

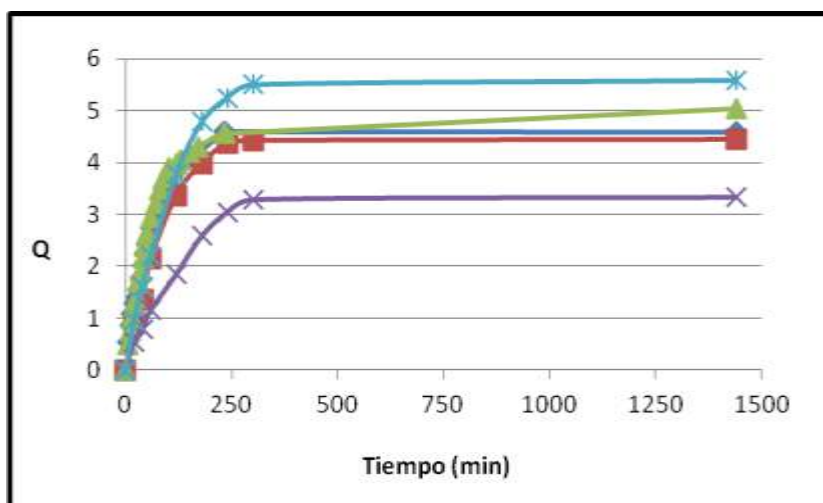


Figura 15. Grado de hinchamiento de geles de NIPAAm (—♦—), NIPAAm 7.5%MP (—■—), NIPAAm 15%MP (—▲—), NIPAAm 15%MP 6%BIS (—×—), NIPAAm 30%MP (—*—), a diferentes tiempos a 25°C.

V.6. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE COLAPSO

El estudio nos da diferentes cinéticas del comportamiento de los geles con respecto al momento de colapso, los datos obtenidos se transforman a grado de hinchamiento.

En la **Figura 16** se podemos observar como el gel de NIPAAm que no contiene micropartículas mantiene una cinética de colapso muy lenta la cual se prolonga por un largo periodo indeterminado, se lo podemos atribuir a que se comienza a formar una capa en la parte externa del gel que puede ser llamada piel⁽³⁶⁾ y esto obstruye paulatinamente la liberación de agua por lo tanto el colapso del gel.

Otro caso se observa en el gel del NIPAAm 7.5%NP el cual se colapsa un poco más rápido que el de pura NIPAAm, esto debido a la pequeña cantidad de micropartículas las cuales hacen que el gel expulse el disolvente sin observar una contracción definitiva. Por el contrario los 3 geles restantes que son NIPAAm 15%MP, NIPAAm 15%MP 6%BIS, y NIPAAm 30%MP manifestaron un comportamiento que antes de los 10 minutos los geles están colapsados casi en su totalidad, lo cual nos demuestra que las micropartículas evitan a que se forme esta piel ya que las micropartículas se colapsan más rápidamente y permiten la formación de poros por los que se expulsa la mayor cantidad de disolvente, lo cual era lo esperado y planeado ya que con este comportamiento es requerido para llevar a cabo una liberación pulsátil.

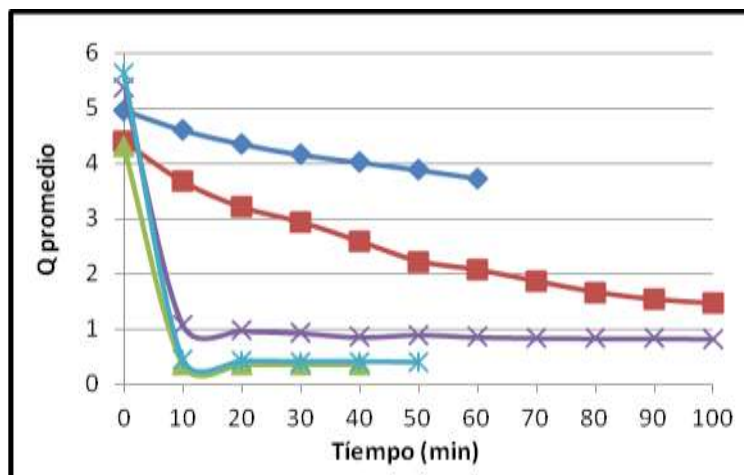


Figura 16. Cinética de colapso de los geles de NIPAAm (—●—), NIPAAm 7.5%MP (—■—), NIPAAm 15%MP (—▲—), NIPAAm 15%MP 6%BIS (—×—), NIPAAm 30%MP (—*—), a diferentes tiempos a 42°C.

V.7. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO/COLAPSO

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 ver si los geles 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.

El análisis de la **Figura 17** nos muestra el grado de hinchamiento con respecto a los ciclos de temperatura, los cuales se definen como el proceso de cambio de temperatura cada hora iniciando con 42°C llevándolo a 25°C una vez que pase por las dos temperaturas se considera 1 ciclo, y estos cambios fueron durante 3 ½ ciclos. Esta nos lleva al análisis del comportamiento de los geles iniciando con el de NIPAAm 0%, el cual nos muestra que tiene una pequeña capacidad de respuesta y es descartada debido su falta de repetitividad en los ciclos.

En el gel NIPAAm 7.5%MP es marcado el comportamiento de las micropartículas ya que se observa que este gel deja fluir una mayor cantidad de agua al momento del colapso, pero no llega a mantener una conducta constante.

Sin embargo en los geles restantes de NIPAAm 15%MP, NIPAAm 15%MP 6%BIS, y NIPAAm 30%MP, en estos 3 se comportan de la misma manera, que nos muestra que los geles tienden a colapsar a 42°C y estos expulsan en su totalidad de disolvente que contienen en los primeros minutos, mientras que en el proceso de hinchamiento ocurre de la misma manera estos inician su incremento que se observa constante, indicando que los procesos de colapso e hinchamiento en los geles es reversible.

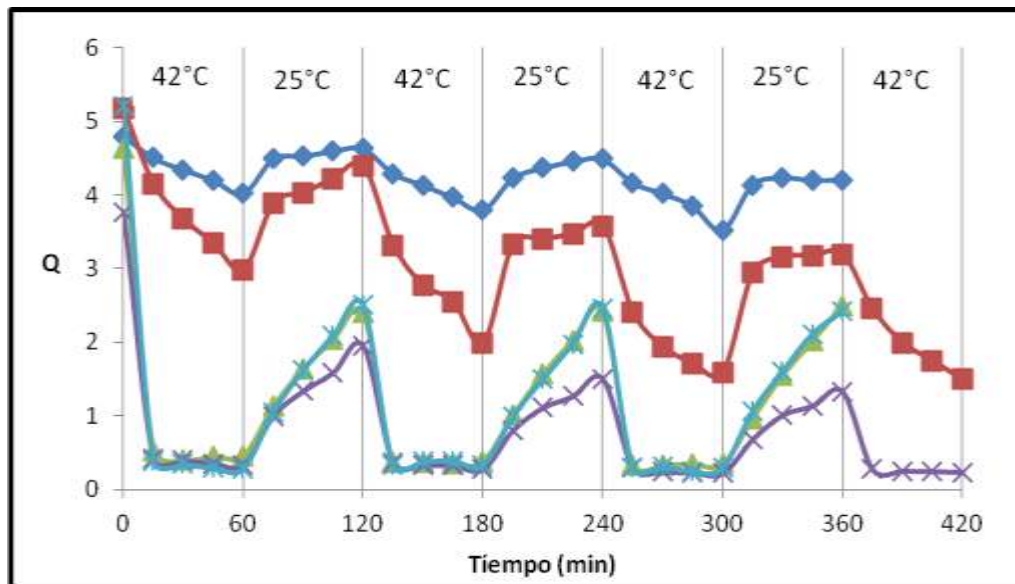


Figura 17. Cinética de hinchamiento/colapso de los geles de NIPAAm (—♦—), NIPAAm 7.5%MP (—■—), NIPAAm 15%MP (—▲—), NIPAAm 15%MP 6%BIS (—×—), NIPAAm 30%MP (—*—), con ciclos de temperatura 25°C y 42°C.

En la **Figura 18** podemos observar los geles en sus tres fases el gel seco, hinchado a 25°C y colapsado a 42°C.

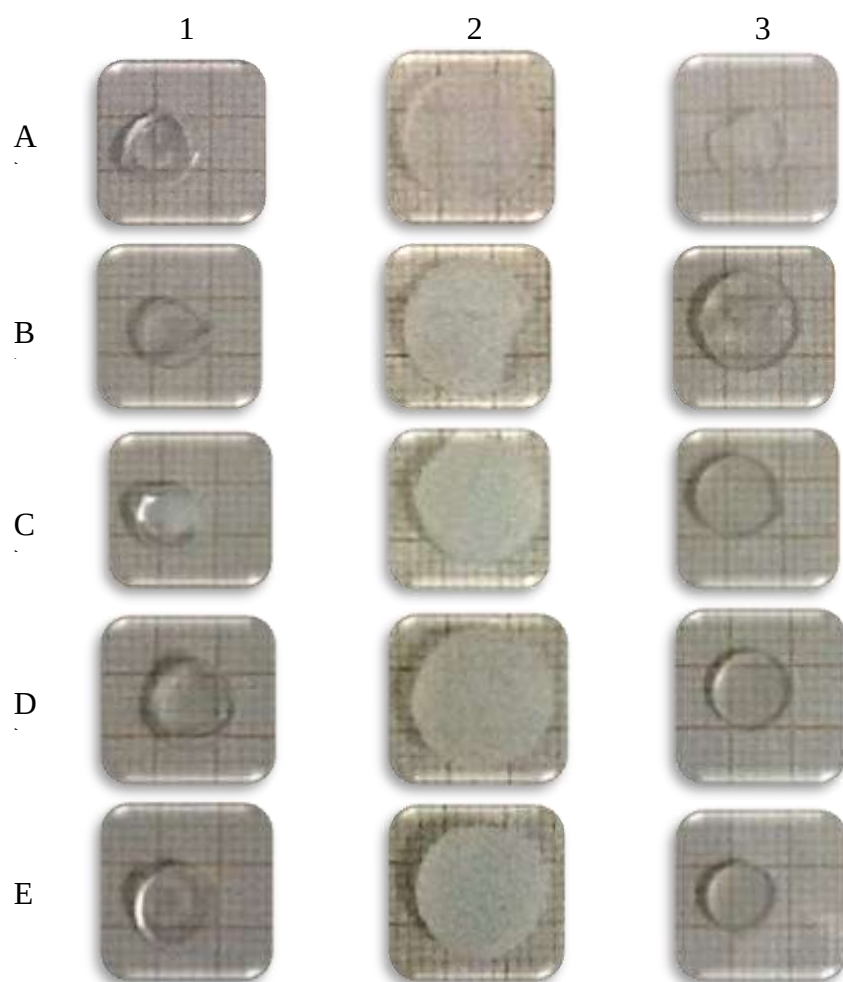


Figura 18. A) Gel NIPAAm, B) NIPAAm 7.5%MP, C) NIPAAm 15%MP, D) NIPAAm 15%MP 6%BIS, E) NIPAAm 30%MP, 1) gel seco, 2) hinchado a 25°C 3) colapsado a 42°C.

V.8. 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 kDa y el citocromo C con un peso de 12,000 Da, con la que posteriormente se determinó la fracción liberada de fármaco.

V.8.1. Evaluación de la cinética de liberación de Vitamina B12

La cinética de liberación se llevó a cabo de manera *in vitro* todos los datos obtenidos se transformaron mediante el cálculo mediante la **Ecuación 3**:

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

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

En la **Figura 19** podemos observar el comportamiento de los geles conforme pasa el tiempo y los cambios de temperatura, lo que nos muestra como el gel libera la Vitamina B12, el primer gel de NIPAAm 0%MP el cual muestra que el gel libera su contenido cuando el gel esta hinchado pero se ve claramente que no libera nada cuando está colapsado, liberando nuevamente en el periodo de hinchamiento y evitándolo cuando está colapsado llegando a 0.97 de fracción libre.

El gel NIPAAm 7.5%MP se comporta liberando una pequeña fracción cuando esta hinchado, pero este al pasar al colapso se ve una liberación marcada y que aumenta lentamente conforme pasa el tiempo y esto es repetitivo llegando a una fracción liberada de 0.97.

El gel NIPAAm 15%MP y 30%MP se comportan de la misma manera liberando un poco cuando están hinchados pero en cuanto sufren la transición de temperatura colapsan en su totalidad en los primeros minutos y liberan todo el fármaco que resta en el gel. Este comportamiento se observa en el gel de NIPAAm 15%MP 6%BIS sin embargo **en**

este gel se puede observar una liberación constante hasta liberar casi la totalidad del fármaco atrapado.

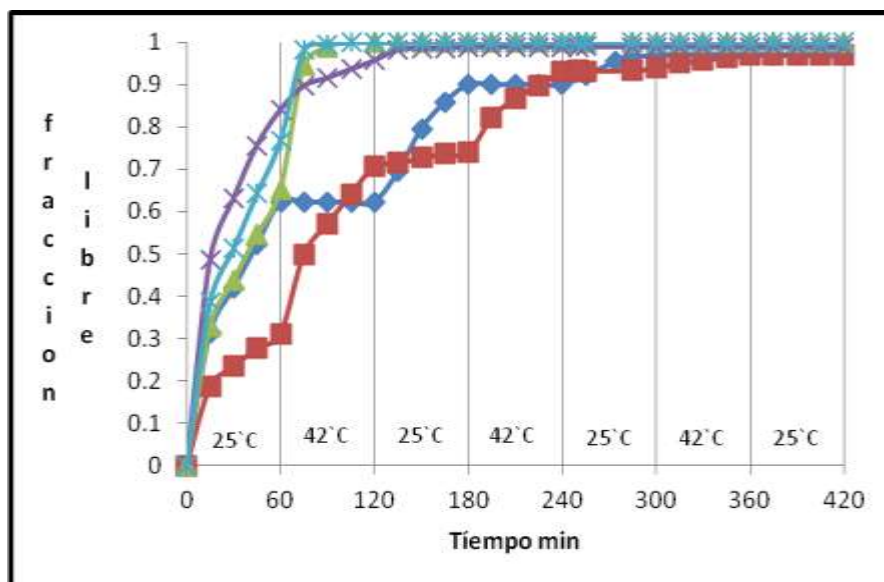


Figura 19. Cinética de liberación Vit B12 de los geles de NIPAAm (—◆—), NIPAAm 7.5%MP (—■—), NIPAAm 15%MP (—▲—), NIPAAm 15%MP 6%BIS (—×—), NIPAAm 30%MP (—✱—), estos variando la temperatura cada hora.

V.8.2. Evaluación de la cinética de liberación de Citocromo C

La cinética de liberación se llevó a cabo de manera *in vitro* con lo cual se puede observar en la **Figura 20** los resultados obtenidos.

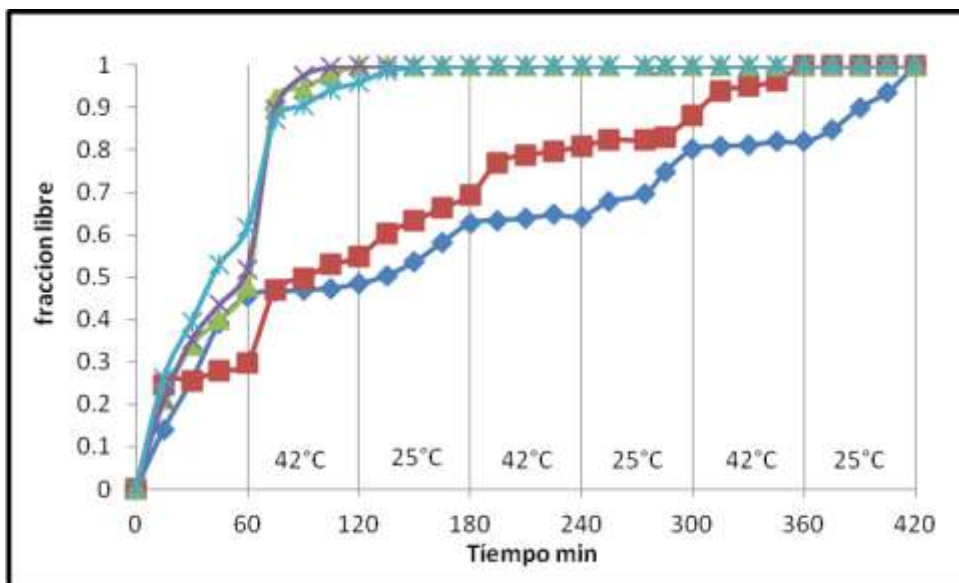


Figura 20 Cinética de liberación Cit C de los gels de NIPAAm (♦), NIPAAm 7.5%MP (■), NIPAAm 15%MP (▲), NIPAAm 15%MP 6%BIS (✕), NIPAAm 30%MP (*), estos variando la temperatura cada hora.

Como se observa el gel de NIPAAm libera la proteína cuando el gel está hinchado, pero nunca cuando está colapsado este sin llegar a liberar por completo a la proteína. El gel NIPAAm 7.5%NP se comporta de manera muy similar liberando el contenido lentamente pero este comenzó a liberar poco cuando está hinchado pero al momento de colapsar sufre un cambio en la liberación siendo este muy evidente, y continúa su proceso liberando en las dos etapas hasta en la 6ta hora que logra liberar todo.

El gel NIPAAm 15% MP, NIPAAm 15%MP 6%BIS y NIPAAm 30%MP, se comportan de la misma manera liberando poco cuando se encuentran hinchados pero dando un brusco cambio al momento de su colapso logrando liberar toda la proteína que estos contenían, solo se observa una pequeña diferencia en el gel NIPAAm 15%MP de los otros dos donde este libera una menor cantidad cuando está hinchado.

En la **Tabla 3** se muestra la cantidad de fármaco que absorbió cada gel estudiado con lo que observamos que la cantidad de Vit B12 que penetra en las redes del gel es mayor que la obtenida para los geles de Cit C lo cual es debido a que esta molécula es más grande y por lo tanto la solución en que se estudio fue solo el 10% con respecto a la Vit B12.

Tabla 3. Cantidad de fármaco cargado por cada gel

GEL NIPAAm		mg Vit B12/ g de Gel	mg Cit C/ g de Gel
0% MP	A	27	2.74
	B	28.6	2.54
7.5% MP	A	25.1	2.83
	B	25.2	3.78
15% MP	A	25.8	1.76
	B	23.9	1.02
15% MP 6%BIS	A	14.7	0.72
	B	14	0.71
30% MP	A	22.9	3.3
	B	20.4	3.43

El presenta trabajo nos muestra la capacidad de estos materiales de exhibir cambios frente a factores como la temperatura, y con esto pueden 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.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Se logró sintetizar 5 geles de *N*-isopropilacrilamida mediante polimerización vía radicales libres, utilizando *N-N*-metilenbisacrilamida como entrecruzante, y micropartículas de NIPAAm en diferentes proporciones.

Los geles obtenidos están conformados por diferentes porcentajes de los anteriores mencionados, NIPAAm 0%MP, NIPAAm 7.5%MP, NIPAAm 15%MP, NIPAAm 15%MP 6%BIS, y por ultimo NIPAAm 30%MP.

En estos geles se determino que su temperatura de transición es de 32-33°C que es igual a la reportada para la NIPAAm.⁽⁹⁾ Se determinó que el grado de entrecruzamiento determina la capacidad que tiene el gel para lograr un máximo hinchamiento, por lo tanto el gel NIPAAm 15%MP 6%BIS tiene la menor capacidad de hinchamiento debido a su mayor grado de entrecruzamiento el cual detiene el proceso, mientras que el gel NIPAAm 30%MP tiene el mayor grado de hinchamiento esto se lo atribuimos a la cantidad de micropartículas que logran hacer el gel mas poroso y ayudan a el incremento del hinchamiento.

En la cinética de colapso comprobó que el gel de NIPAAm 0%MP no tiene la capacidad de colapsar de manera rápida y este se comporta colapsando lentamente formando una propia piel que detiene el flujo de disolvente, mientras que los geles con micropartículas de 15% y 30% sufren un colapso a los pocos minutos lo cual se traduce en una rápida liberación de fármacos cuando los geles microestructurados se colapsan.

Estos geles de NIPAAm 15%MP, 15%MP 6%BIS, y 30%MP, demostraron ser geles con un comportamiento de hinchamiento/colapso reversibles manteniendo sus propiedades y su forma. Mientras que los geles de NIPAAm 0%MP se observa que se

mantiene reproducible su comportamiento pero estos sin colapsar de forma drástica indicando que mantiene atrapado el disolvente.

Con lo observado en el comportamiento de los geles microestructurados logramos demostrar que la fragilidad de los geles de NIPAAm disminuye con la incorporación de micropartículas del mismo material, ya que estas brindan puntos de entrecruzamiento formando así materiales con una mayor porosidad.

Con la cinética de liberación demostramos que durante el estado hinchado el gel de NIPAAm 0%MP tiende a liberar las macromoléculas, mientras que los geles con micropartículas incorporadas tienden a liberar el fármaco cuando se colapsa mostrando una liberación más rápida, lo que nos lleva a concluir que la combinación del gel de NIPAAm con micropartículas de este mismo material inteligente es relevante para la liberación de fármacos.

Con todo lo anterior determinamos que los geles tienen la capacidad de liberar a altas temperaturas lo cual 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 del fármaco.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

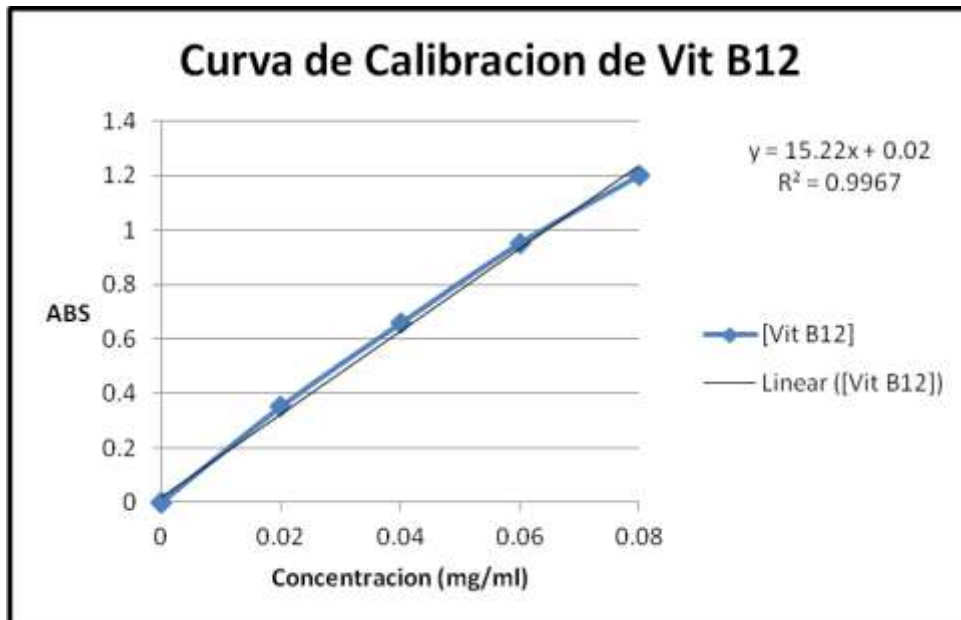
1. D.M.Garcia; J.L. Escobar; N. Bada y J. de D. Casquero. Estudio de transición crítica a temperaturas bajas en hidrogeles termosensibles: Rev. Bioingeniería (2005)
2. Alejandro Arredondo; Marta Elena Londono. Hidrogeles . Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. Rev Ing Biomedica. (2009)
3. M.R.Aguilar, C.Elvia, A.Gallardo, B.Vazquez, and J.S.Roman. Smart polymers and their applications as biomater. Biomaterials cap.6
4. Yong Qiu, Kinam Park. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews (2001) 321-339
5. Julio C. Cuggino, Dra Cecilia Alvarez. Síntesis de hidrogeles para su posible aplicación en liberación controlada de drogas. (2008)
6. Jose M. Gonzalez Saiz, Consuelo Pizarro Millan. Geles polimericos: aplicaciones en biotecnología (1994)
7. Villafuerte Robles Leopoldo. Nanotecnología Farmaceutica.
8. Tanaka T (1978). Collapse of gels in the critical endpoint. Phys Rev 40:820-834
9. Si-Xue Chang, Jian-Tao Zhang, Ren-xi Zhuo. Macroporous poly(N-isopropilacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved protein release properties. (2003)
10. M. Carrillo, M. Vivas, L. Jimenez, L. Hernandez. Síntesis de hidrogeles de poli(acido itaconico-co-metacrilato de metilo. Rev. Iberoamericana de polímeros (2009)
11. Blanca Rojas, Marvelis Ramirez, Rocelis Aguilera. Los hidrogeles polimericos como potenciales reservorios de agua y su aplicación en la germinación de semillas de ome en diferentes tipos de suelos. (2006)
12. Lura SerraBigas, Jose Domenech, Nicholas A peppas. Diseño y síntesis de hidrogeles acrílicos modificados para la liberación controlada de fármacos.
13. Jung Kwon Oh, Ray Drumright, Daniel J. Siegwart. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. (2008)
14. 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
15. Nuevas formas farmaceuticas de liberacion modificada
16. Virginia Saez, Estibaliz, Leyre Lopez. Liberacion controlada de fármacos. Aplicaciones Biomedicas (2003)
17. Rodriguez, I.C. Cerexo A. Salem. Sistemas de liberación Bioadhesivos.
18. M. F. Leal Denis, J. M. Lazaro Martinez. Sistemas de liberacion sostenida de proteínas por via oral basados en nuevas matrices. (2008)
19. Tarun Garg, Arsh Chanana, Ankit Gupta. Pulsatile drug delivery systems: pulsincap system Journal of pharmacy (2012)
20. Lisette Aguero, Dionisio Zaldivar, Jorge Luis Escobar. Liberacion de cefalexina a partir de hidrogeles de poli(acrilamida-co-acido metacrilico) (2000)

21. Reynaldo Leon Almaraz, Mario Alberto Ramirez Cruz. Sintesis, caracterización y aplicación del PS entrecruzado a partir de residuos de PS Rev. Iberoamericana de polímeros (2007)
22. L.j. Puig. J. C Sanchez Diaz M. Villacampa. Microstructured polyacrylamide hydrogels prepared via inverse microemulsion polymerization. Jouernal of colloid and interface science (2001)
23. S.M. Nuño-Donlucas^a, J.C. Sánchez-Díaz^a, M. Rabelero^a, J. Cortés-Ortega^b Microstructured polyacrylamide hydrogels made with hydrophobic nanoparticles. (2004)
24. 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)
25. M. Carrillo, M. Vivas, L. Jimenez, L.Hernandez. Sintesis de hidrogeles de poli(acido itaconico-co-metacrilato de metilo)
26. Park, k.; Shalaby, W.S.W.; Park, H. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. Estados Unidos: Technomic Publishing AG., 1993. pp.100
27. 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
28. Remington Farmacia, 20va edición pag, 1074, editorial medica panamericana
29. Issa A. Katime Amashta. Hidrogeles inteligentes
30. Jua Rueda, Stefan Zschoche, Hartmut Komber. Dirk Schmaljohann, Sintesis y caracterizacion de polímeros termosensibles
31. 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
32. Langer, R.; Peppas, N.A. *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology*. AIChE J. (2003) 49:2990-3006
33. Aurora Reillo Martin, Francisco Javier Nvarro Lupion, Pilar Bustamante Martinez. Estudio del hinchamiento de la hidroxipropilmetilcelulosa en función de la polaridad del disolvente.
34. Eduardo Rogel, Angel Licea Jose Manuel Cornejo. Preparacion de hidrogeles anfífilicos sensibles a diferentes valores de pH utilizando monómeros acidos con espaciadores hidrofobicos. (2003)
35. Pinzón, N.; Katime, I.; Espinosa, A.; Perilla, J.; Hernáez, E. *Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en hidrogeles*. Rev. Iber. Polím. (2002) 3:39-54
36. Dong L, Hoffman AS. A novel approach for preparation of pH sensitive hydrogels for enteric drug delivery. J Contr Rel 1991:15:141-52
37. Piñón, E.; Quintanar, D.; Zorraquín, B.N.; Ganem, A.; Nava, M.G.; Cornejo, J.M. *Controlled release of model substances from pH sensitive hydrogels*. J. Mex. Chem. Soc. 2008 52:272-278

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

ANEXO 1



ANEXO 2

