



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

“Síntesis de nanogeles núcleo-coraza sensibles a la temperatura y al pH para el cargado y la liberación de fármacos”

TRABAJO DE TESIS

Presentado por

M.C. Aracely Serrano Medina

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Co-Director de tesis

Dr. Ángel Licea Claverie

TIJUANA, B.C.

JUNIO DEL 2011

DEDICATORIA

No sé a quién dedicar este trabajo, sólo sé que disfruté mucho mi trabajo del doctorado todo este tiempo, tal vez a mí misma y a mis dos pequeños, Lucia y Adrian.

INDICE

Hoja de aprobación.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Lista de abreviaturas.....	xi
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tablas.....	xviii
Agradecimientos.....	xx
Reconocimientos institucionales.....	xxii
Vita.....	xxiii
Resumen.....	xxiv
Summary.....	xxv

CAPITULO I INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes.....	2
I.2 Justificación.....	5
I.3 Objetivos generales.....	7
I.4 Objetivos particulares.....	7

CAPITULO II TEORIA GENERAL

II.1 Nanotecnología y nanobiomedicina.....	10
II.2 Nanosistemas como acarreadores farmacéuticos.....	11

II.3	Nanosistemas poliméricos para la liberación de fármacos.....	13
II.3.1	Micela poliméricas.....	13
II.3.2	Dendrímeros.....	14
II.3.3	Liposomas.....	15
II.3.4	Nanogeles.....	16
II.4	Desarrollo de nanogeles para aplicaciones biomédicas.....	18
II.4.1	Polimerización heterogénea por radicales libres.....	19
II.4.1.1	<i>Polimerización en suspensión.....</i>	21
II.4.1.2	<i>Polimerización en dispersión.....</i>	21
II.4.1.3	<i>Polimerización en emulsión.....</i>	22
II.4.1.4	<i>Polimerización en emulsión sin detergente.....</i>	24
II.4.1.5	<i>Polimerización núcleo-coraza.....</i>	26
II.5	Técnicas de caracterización de nanosistemas poliméricos.....	27
II.6	Cargado de nanogeles con fármacos y biomoléculas.....	31
II.7	Principios de la liberación controlada de fármacos en nanogeles.....	35

CAPITULO III EXPERIMENTAL

III.1	Generalidades.....	40
III.2	Síntesis de los polímeros entrecruzados de NIPAAm/EGDMA, mediante la técnica de polimerización en dispersión.....	45
III.2.1	Purificación de la NIPAAm por recristalización.....	45

III.2.2	Síntesis de los nanogeles de NIPAAm entrecruzados con EGDMA.....	45
III.3	Síntesis de nanogeles núcleo-coraza mediante polimerización en emulsión sin detergente,	47
III.3.1	Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/EGDMA...	47
III.3.2	Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/DVA.....	49
III.4	Síntesis del ácido metacrililoiloxi-o- benzoico (MAOB).....	50
III.5	Síntesis de nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante polimerización en emulsión sin detergente.....	51
III.5.1	Síntesis de nanogeles de NIPAAm/EGDMA/MAOB.....	52
III.5.2	Síntesis de nanogeles de NIPAAm/DVA/MAOB.....	53
III.6	Técnicas de caracterización para los nanogeles sintetizados de NIPAAm/MAOB.....	54
III.7	Liofilización y reconstitución de nanogeles.....	55
III.8	Síntesis a gran escala de nanogeles NIPAAm/MAOB mediante polimerización en emulsión sin detergente.....	56
III.9	Cargado de los nanogeles.....	58
III.9.1	Cargado de los nanogeles con 5-Fluorouracilo.....	58
III.9.2	Cargado de los nanogeles con Doxorrubicina.....	59
III.9.3	Curva de calibración de 5-Fluorouracilo por HPLC.....	60
III.9.4	Curva de calibración de la DOX por UV-VIS.....	61
III.10	Estudios de liberación controlada de fármacos.....	61
III.10.1	Degradación del DVA.....	62

III.10.2	Estudios de liberación de nanogeles cargados con 5- FU.....	62
III.10.3	Estudios de liberación de nanogeles cargados con DOX.....	63
III.10.4	Curva de calibración de 5-FU por UV-VIS.....	64
III.10.5	Curva de calibración de DOX por UV-VIS.....	64

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1	Síntesis de los polímeros entrecruzados de NIPAAm/EGDMA mediante la técnica de polimerización en dispersión.....	66
IV.1.1	Síntesis de nanogeles de NIPAAm entrecruzados con EGDMA.....	66
IV.2	Síntesis de nanogeles núcleo-coraza vía polimerización en emulsión sin detergente.....	68
IV.2.1	Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/EGDMA.....	69
IV.2.2	Reconstitución y liofilización de los nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/EGDMA.....	72
IV.2.3	Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/DVA.....	76
IV.2.4	Reconstitución y liofilización de los nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/DVA.....	78
IV.3	Síntesis del monómero metacrililoixi-o-benzoico (MAOB).....	81
IV.4	Síntesis de nanogeles de NIPAAm/MAOB vía polimerización en emulsión sin detergente.....	83
IV.4.1	Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante dispersión de luz dinámica (DLS).....	84

IV.4.2	Liofilización y reconstitución de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/MAOB.....	89
IV.4.3	Determinación del Potencial Z para nanogeles NIPAAm/MAOB.....	92
IV.4.4	Determinación del MAOB incorporado en los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante titulaciones ácido-base	93
IV.4.5	Caracterización de los nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/MAOB por su efecto con el pH vía DLS	94
IV.4.6	Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	98
IV.4.7	Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	100
IV.4.8	Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM).....	101
IV.5	Síntesis a gran escala de nanogeles NIPAAm/MAOB vía polimerización en emulsión sin detergente.....	103
IV.6	Cargado de los nanogeles.....	106
IV.6.1	Cargado de los nanogeles con 5-Fluorouracilo.....	106
IV.6.2	Curva de calibración del 5-Fluorouracilo por HPLC.....	107
IV.6.3	Cargado de los nanogeles con Doxorrubicina.....	108
IV.7	Estudios de liberación controlada de fármacos.....	110
IV.7.1	Degradación del DVA.....	111
IV.7.2	Estudios de liberación controlada de nanogeles cargados con 5-FU.....	112
IV.7.3	Estudios de liberación controlada de nanogeles cargados con DOX.....	114

CAPITULO V CONCLUSIONES.....	122
REFERENCIAS.....	123
ANEXOS.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica
APS	Persulfato de Amonio
CMC	Concentración micelar crítica
Dh	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DMA	Dimetilacetamida
DOX	Doxorrubicina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DVA	3,9-Divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EM	Microscopia Electrónica
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
kcps	Miles de cuentas por segundo
LCST	Temperatura Crítica Inferior de Solución
LD	Difracción de Láser
MAOB	Acido Metacrililoiloxi- <i>o</i> -benzoico
MPS	Sistema Fagocítico Mononuclear
NIPAAm	<i>N</i> -isopropilacrilamida
nm	nanómetro

PAA	Acido poliacrílico plurónico
PAETMAC	Cloruro de poli(acriloiloxi)etiltrimetilamonía
PCS	Espectroscopía de fotocorrelación
PEG	Polietilenglicol
PEGMAM	Polietilenglicol metiléter metacrilato
PEO	Poli (óxido de etileno)
PMA	Poli(ácido metacrílico)
pNIPAAm	Poli (<i>N</i> -isopropilacrilamida)
PPG	Propilenglicol
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
Tg	Temperatura de transición vítrea
UV-VIS	Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Micelas poliméricas formadas mediante auto ensamblaje de copolímeros: de PEO y complejos poli iónicos.....	14
2	Nanogel con coraza de PEG funcionalizado con grupos carboxilo sensibles al pH.....	15
3	Características de la cinética e intervalo de tamaños de las partículas poliméricas producidas por diferentes métodos de polimerización heterogénea.....	20
4	Esquema de la primera fase de la polimerización en emulsión....	23
5	Esquema de la polimerización en emulsión sin detergente.....	25
6	Diagrama de la función de un instrumento convencional de dispersión de luz dinámica (DLS).....	28
7	Potencial Z.....	30
8	Factores que afectan el hinchamiento de los nanogeles.....	35
9	Liberación de fármacos a partir de nanogeles.....	38
10	Ruta de síntesis para la formación de nanogeles vía polimerización en dispersión.....	46
11	Ruta de síntesis para la formación de nanogeles núcleo-coraza.	47
12	Ruta de síntesis para la obtención del MAOB.....	51
13	Ruta de síntesis para la formación de nanogeles con núcleo ácido.....	52
14	Diagrama de flujo para el cargado de los nanogeles con 5-Fluorouracilo.....	58
15	Diagrama de flujo para el cargado de los nanogeles con DOX.....	60

16	Distribución de tamaños por volumen de los microgeles entrecruzados con diferentes proporciones molares de EGDMA..	67
17	Barrido de temperaturas y la derivada del conteo de la dispersión de luz para hidrogeles entrecruzados con EGDMA _{1%mol}	68
18	Barrido de temperaturas de los nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA _{5%mol}	70
19	Distribuciones de tamaños por volumen de nanogeles de NIPAAm:PEGMAM (60:40)/EGDMA _{1%mol}	71
20	Efecto de la concentración del entrecruzante (EGDMA) en nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)	71
21	Distribución de tamaños por volumen de nanogeles liofilizados y reconstituidos de NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA _{1%mol}	74
22	Barrido de temperaturas de nanogeles entrecruzados con EGDMA _{5%} liofilizados y reconstituidos.....	74
23	Distribución de tamaños por volumen de nanogeles entrecruzados con EGDMA _{5%} liofilizados y reconstituidos.....	75
24	LCST de los nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA _{5%mol}	75
25	Distribución de tamaños por volumen de nanogeles con entrecruzados con DVA.....	77
26	Barrido de temperaturas para nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol}	78
27	Distribución de tamaños por volumen de los nanogeles NIPAAm:PEGMAM(70:30)/DVA _{1%} liofilizados y reconstituidos.....	80
28	Distribución de tamaños por volumen de nanogeles entrecruzados con DVA _{5%} liofilizados y reconstituidos.....	80
29	Efecto de la temperaturas en el Dh de nanogeles entrecruzados con DVA _{5%} liofilizados y reconstituidos.....	81

30	Distribución de tamaños por volumen de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB a 26°C.....	85
31	Distribución de tamaños por volumen de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB a 26°C.....	85
32	Distribución de tamaños por volumen a 26°C de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB y NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB.	86
33	Efecto de la temperatura de nanogeles NIPAAm/PEGMAM/EGDMA variando las proporciones de MAOB.....	86
34	Efecto de la temperatura de nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA variando las proporciones de MAOB.....	87
35	Efecto de la temperatura en el Dh y LCST de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB _{10%mol}	88
36	Efecto de la temperatura en el Dh y LCST de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB _{10%mol}	88
37	Distribución de tamaños por volumen a 26°C de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{10%mol}	91
38	Distribución de tamaños por volumen a 26°C de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{10%mol}	91
39	Potencial Z de los nanogeles en diferentes proporciones de MAOB	92
40	Efecto del pH y la temperatura en el Dh en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/MAOB _{10%mol} /EGDMA _{5%mol}	95
41	Efecto del pH y la temperatura en el Dh de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB _{15%mol}	96
42	Efecto del pH y la temperatura en el Dh en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB _{10%mol}	96

43	Efecto del pH y la temperatura en el Dh en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB _{15%mol}	97
44	Termograma de nanogeles de NIPAAm//PEGMAMA/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	99
45	Termograma de nanogeles de NIPAAm//PEGMAMA/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	99
46	AFM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	100
47	AFM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAMADVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	101
48	TEM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	102
49	TEM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	103
50	Dh a 26°C de nanogeles sintetizados a gran escala de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} comparados con los nanogeles sintetizados en 50 mL de agua.....	105
51	Dh a 26°C de nanogeles sintetizados a gran escala de NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} comparados con los nanogeles sintetizados en 50 mL de agua.....	105
52	Cargado de nanogeles NIPAAm/PE GMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} con DOX.....	109
53	Análisis de degradación de nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} expuestos a pH 5.5.....	110
54	Degradación de DVA.....	112
55	Liberación del 5-Fluorouracilo a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} , a diferentes condiciones.....	113
56	Liberación del 5-Fluorouracilo a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} , a diferentes condiciones.....	114

57	Liberación de la DOX a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} , a diferentes temperaturas y pH.....	115
58	DOX incorporada en los nanogeles de composición NIPAAm/PE GMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} después de la liberación a 36 hrs.....	116
59	Liberación de la DOX a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} con DOX, a diferentes condiciones.....	117
60	DOX incorporada en los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol} después de la liberación a 36 hrs.....	118

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Concentraciones de EGDMA utilizadas en cada solución acuosa.....	46
2	Concentraciones de NIPAAm, PEGMAM y EGDMA utilizadas en cada una de las soluciones acuosas.....	48
3	Concentraciones de DVA utilizadas en las soluciones acuosas.....	49
4	Concentraciones de MAOB utilizadas en las reacciones estudiadas.	52
5	Concentraciones de entrecruzantes e iniciador utilizados en cada una de la reacciones a granescala.....	57
6	Condiciones fisiológicas de las células en diferentes estados.....	62
7	Dh de los nanogeles sintetizados con NIPAAm/EGDMA a 26°C.....	66
8	Dh de los nanogeles sintetizados con NIPAAm/PEGMAM/EGDMA a 26°C.....	69
9	Dh de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM(70:30)/EGDMA reconstituidos a 26°C	73
10	Dh de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM(70:30)/DVA a 26°C	76
11	Dh de los nanogeles de composición, NIPAAm/PEGMAM(70:30)/DVA reconstituidos a 26°C.....	79
12	Datos de los espectros y rendimiento de la síntesis del MAOB.....	82
13	Dh de los nanogeles entrecruzados con EGDMA y DVA a 26°C.....	84
14	Rendimiento de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM/MAOB.....	89
15	Dh de los nanogeles liofilizados y reconstituidos de NIPAAm/MAOB a 26°C.....	90

16	Cantidad de MAOB incorporado al núcleo de los nanogeles.....	93
17	Dh de los nanogeles sintetizados a gran escala.....	104
18	Eficiencia de carga y % de carga en nanogeles cargados con 5Fluorouracilo.....	107
19	Eficiencia de carga y % de carga en nanogeles cargados con DOX..	108

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer al Dr. Ángel Licea Claveríe, de quien siento una profunda admiración por su gran desempeño y ética profesional, por la confianza y la atención puesta en mí durante todo este tiempo, le agradezco el haberme tenido la confianza para trabajar con su grupo de polímeros, en el cual me sentí en confianza y muy agusto.

Quiero agradecer también al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por su valioso apoyo y sus consejos profesionales durante todo este tiempo, y el que vendrá.

Agradezco a los integrantes de mi comité, al Dr. Mario Del Valle Granados, a la Dra. Georgina Pina Louis, al Dr. Samuel Meléndez López, por su interés en este proyecto. Agradezco también a la M.C. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo por su cooperación y su disponibilidad en todo momento.

Agradezco profundamente a mis compañeros de laboratorio de Biofarmacia, Claudia, Angélica, Dalia, Omar, Ayla, Karla, a Héctor Magaña, etc... Por haber trabajado en armonía y con mucha diversión. En el laboratorio se sentía mucha armonía y buenas vibraciones con todos ustedes.

Quiero agradecer muy especialmente al Q.F.B Víctor Gómez, por su gran apoyo en todo momento para la realización de este proyecto, por su gran amistad, y su gran sentido de responsabilidad, te felicito, te espera un futuro brillante.

Agradezco profundamente a mis compañeros de laboratorio de Polímeros Sandra, quien me ayudó en todo momento, gracias por tu paciencia, a Pedro Navarro, Lorenzo Picos, Norma Cortés, y como siempre a Alejandro Vega; por haber trabajado en armonía y con mucha diversión. En el laboratorio me sentí muy agusto con todos ustedes.

A todo el personal académico y administrativo del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana que contribuyó en mi aceptación para realizar parte de este proyecto en el laboratorio de polímeros.

A todo el personal académico y administrativo de la Universidad Autónoma de Baja California, que contribuyó a mi seguridad como profesional y a la realización de gran parte de este proyecto.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Polímeros del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección del **Dr. Ángel Licea Claverie** y en el Laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la dirección del **Dr. José Manuel Cornejo Bravo**.

Se agradece el apoyo por la beca otorgada No. 172622 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de estudios de posgrado y el desarrollo de esta investigación.

A todo el personal académico y administrativo del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana que contribuyó en mi aceptación para realizar parte de este proyecto en el laboratorio de polímeros.

VITA

Noviembre 22, 1972

Nacida en Culiacán, Sinaloa, México

2003

Químico Farmacobiólogo

2004-2005

Trabajo en Probiomed, S.A. de C.V.

2005

Inicio de estudios de Maestría en Ciencias en Química, en el Instituto Tecnológico de Tijuana.

2008

Inicio de estudios de Doctorado en Ciencias e Ingeniería, en la Universidad Autónoma de Baja California.

RESUMEN

En este proyecto se estudiaron la síntesis y propiedades de nanogeles núcleo-coraza sensibles a la temperatura y pH, donde el núcleo entrecruzado está constituido por un copolímero de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB), mientras que la coraza está constituida por las cadenas de el polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMAM) que emanan del núcleo. Se sintetizaron los nanogeles vía polimerización por emulsión sin detergente, utilizando al PEGMAM como estabilizante; se estudió la influencia de las concentraciones del PEGMAM y de dos diferentes entrecruzantes y del MAOB en el tamaño de los nanogeles, la capacidad de hinchamiento y colapso con respecto a la temperatura y al pH; así como la estabilidad de los nanogeles. El tamaño de partícula y el número de distribuciones se determinaron por Dispersión de Luz Dinámica (DLS), por microscopías electrónicas AFM y TEM. Se obtuvieron nanogeles monodispersos con diámetro hidrodinámico (D_h) entre 100-400 nm a 26°C, 60-300 nm a 37°C y 40-200 nm a 50°C, todas con una sola distribución de tamaños. Con la finalidad de estudiar la estabilidad de la emulsión, se realizaron estudios de potencial Z en diferentes valores de pH y titulaciones ácido base para cuantificar los grupos aniónicos en el núcleo de los nanogeles. Los nanogeles con la mejores características en tamaño (<200 nm), y de respuesta al pH y la temperatura se sintetizaron a gran escala y se evaluó su capacidad para ser cargados con fármacos modelos. Finalmente se evaluó la cinética de liberación de los nanogeles cargados bajo condiciones de pH y temperatura.

SUMMARY

**“Synthesis of core-shell nanogels, sensitive to temperature and pH for
the loading and release of drugs”**

by

M.C. Aracely Serrano Medina

To obtain

The Doctorate in Sciences and Engineering

Universidad Autónoma de Baja California, 2011

José Manuel Cornejo Bravo, PhD

Thesis advisor

Angel Licea Claveríe, PhD

Co thesis advisor

The synthesis and properties of a thermal/pH-sensitive core-shell copolymer latex were investigated, the crosslinked core consisted of a copolymer of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) and methacryloyloxy-*o*-benzoic acid (MAOB). These polymers were synthesized in an aqueous soap-free emulsion polymerization system. The acidic core, and shell were stabilized by poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate PEGMEM brush chains emanating there from nanogels. The influence of PEGMEM content, and two different crosslinkers and MAOB concentrations on size and transition temperature swelling capacity and the stability of the nanogels were studied. The nanogels particle size distributions were determined both by dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM). Monodisperse particles were produced with hydrodynamic diameters between 200-550 nm (at 25°C) and 150-250 nm (at 50°C). Zeta Potential studies of the emulsion at different pH and acid-base titration studies confirm the presence of anionic charges on the nanogels.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

I.1 ANTECEDENTES

Los mecanismos de acción de los medicamentos utilizados convencionalmente muestran, entre algunas de sus dificultades generales, la imposibilidad para trasladar a los principios activos de forma directa a regiones específicas del organismo. La distribución sistémica de los fármacos provoca reacciones adversas y toxicidad asociada a los mismos. Para resolver esta situación se busca la vectorización de los fármacos, es decir, liberar los fármacos directamente en el sitio de acción, en la cantidad adecuada y en el momento preciso que se requiera. Para esto es necesario desarrollar sistemas de liberación que deban cumplir con ciertas características, como son, la baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y una larga vida media en el organismo. Todas estas características son favorecidas con por la aplicación de la nanotecnología en este campo, la cual permite que por medio de la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, se libere el fármaco sólo hacia células que necesiten del tratamiento farmacológico.¹

Dentro de los sistemas de liberación de fármacos a escala nanométrica se encuentran los nanogeles inteligentes, los cuales se definen como una red polimérica ligeramente entrecruzada que se encuentra embebida en un disolvente o solución; estos dispositivos han sido ampliamente utilizados en los sistemas de liberación de fármacos, ya que permiten la liberación de forma menos invasiva y tóxica para tejidos que no requieran del tratamiento farmacológico. Es decir, la escala nanométrica permite que dichos dispositivos de transporte interaccionen con poros de las membranas celulares de una manera selectiva.² Se requiere que los

nanogeles tengan un tamaño menor a los 200 nm para que se facilite la entrada del nanogel a la célula por endocitosis para incorporarse al interior celular, de manera simultánea se reduce la captura de las nanopartículas por el sistema fagocítico mononuclear (MPS, por sus siglas en inglés); La vectorización de nanogeles hacia tejidos blanco se ha logrado mediante la bioconjugación de la superficie del nanogel con ligandos específicos que pueden reconocer receptores en células dañadas. En el caso de la vectorización a tejidos cancerígenos, los ligandos efectivos para células cancerígenas incluyen derivados del ácido fólico, péptidos, proteínas, y anticuerpos³. Se ha demostrado que las nanopartículas pueden acumularse de manera pasiva (aun sin la bioconjugación con ligandos específicos), en los tumores cancerígenos debido a que estos presentan un endotelio más permeable (poros de mayor diámetro) que los tejidos sanos, por lo que nanogeles con un diámetro entre 50 y 200 nm son útiles para liberar fármacos de manera selectiva en tumores cancerígenos.^{4,5} Una característica indispensable de las nanopartículas con aplicación farmacéutica es que sean biocompatibles, esto se puede lograr si las nanopartículas contienen cadenas de polietilenglicol (PEG) en su superficie, el cual les proporciona propiedades de camuflaje en el torrente sanguíneo, asegurando su persistencia en la circulación sanguínea. Una vez que el nanogel penetra en el tejido blanco es necesario un mecanismo que permita la liberación del fármaco. Una estrategia es el desarrollo del fenómeno de estímulo-respuesta de nanopartículas “PEGiladas” mediante la incorporación de segmentos de polímeros inteligentes que puedan inducir cambios importantes en las

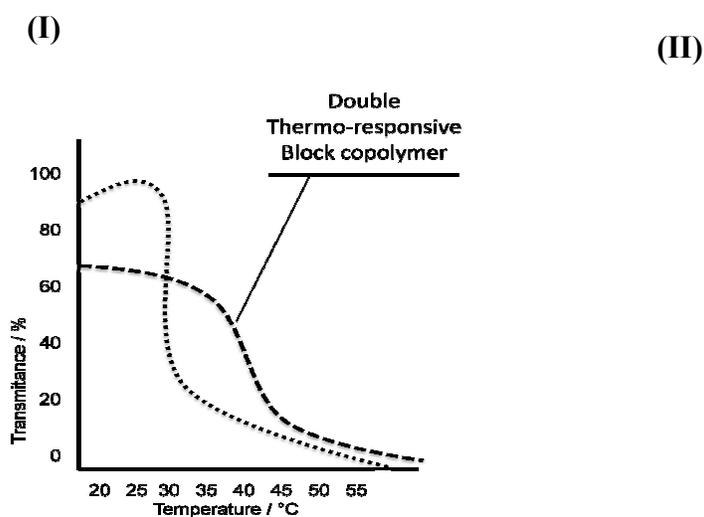
características de las partículas en respuesta a estímulos externos tales como metabolitos, fuerzas iónicas, temperatura, pH, etc.⁶ En particular, se han diseñado nanopartículas “pegiladas” que responden al pH, para aplicaciones biomédicas, tomando en cuenta que los tumores, la piel, y los endosomas/lisosomas presentan un pH más ácido comparado con el tejido normal (pH 7.4). Un estímulo que es de gran interés, es la temperatura, considerando que los tumores, debido a su acelerado metabolismo, presentan mayor temperatura que el tejido sano y además que además, es factible incrementar la temperatura en una área específica del cuerpo mediante una fuente de calor externa. Uno de los materiales termosensibles más estudiados es la (N-isopropilacrilamida) (NIPAAm) ya que los polímeros lineales de este material sufren una transición de fase de ovillo expandido a glóbulo contraído (soluble a precipitado) mientras que los hidrogeles sufren una transición de hinchado a colapsado a una temperatura crítica (LCST) de aproximadamente 32°C.^{6, 7} Dada la proximidad de la LCST a la temperatura corporal (37°C), la poli(NIPAAm) (PNIPAAm) es un candidato potencial para ser utilizado como acarreador biomédico, tanto como polímero lineal, hidrogel o copolímero. La PNIPAAm se ha estudiado para el suministro de fármacos a tumores, en recubrimientos termosensibles, en micelas para la liberación controlada de fármacos, y como superficie de fijación-desprendimiento de células vivas. La PNIPAAm se ha utilizado también en soluciones oftálmicas, ya que no se ha encontrado que presente citotoxicidad *in vitro*.⁸

I.2 JUSTIFICACIÓN

La obtención de nanogeles mediante polimerización en emulsión o microemulsión ha sido ampliamente documentada. La gran desventaja de este método es el uso de altas concentraciones de tensoactivo, el cual resulta altamente difícil de eliminar. Por lo tanto es indispensable desarrollar metodologías para obtener nanogeles que no requieran del uso de tensoactivos. Se requiere, además, que el método de preparación sea sencillo y que permita producir nanogeles a gran escala para realizar estudios de cargado y liberación con una variedad de fármacos. La liberación del fármaco del núcleo de los nanogeles, se puede lograr utilizando materiales sensibles a la temperatura y/o al pH. El material sensible a la temperatura más estudiado es la N-isopropilacrilamida (NIPAAm) la cual tiene una temperatura de transición de 32 °C, que es un valor inferior a la temperatura corporal (I), por ello resulta necesaria la adición de grupos hidrofílicos o ionizables para ajustar la temperatura de transición. Por otra parte, el cargado de fármacos insolubles en agua en estas estructuras nanométricas se ve limitada por la pobre afinidad con los núcleos de las partículas estudiadas; además, la presencia de grupos aniónicos en el núcleo de la partícula incrementa considerablemente la interacción con fármacos catiónicos (ej. Doxorubicina)(II).

En este proyecto se pretende obtener nanogeles mediante la polimerización por emulsión sin detergente de metacrilato y de polietilenglicol. Se espera que el macrómero funcione como emulsificante. El núcleo estará formado por el material sensible a la temperatura NIPAAm para que el sistema tenga respuesta al

mencionado factor. Se ajustará la temperatura de transición con un monómero ácido; es necesario usar un monómero ácido hidrofóbico para que se incorpore a la fase discontinua de la emulsión y se integre al nanogel. Para éste fin, se ha seleccionado al ácido metacrioloxi-*o*-benzoico (MAOB) (III). En una proporción que oscilará entre el 5 y 15%. Los nanogeles obtenidos serán evaluados por su capacidad para ser cargados con fármacos modelo (neutro, básico y ácido). Se evaluará la cinética de liberación de los geles cargados bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica.



(III)

I.3 OBJETIVOS GENERALES

- a) Sintetizar y caracterizar nanogeles con coraza de polietilenglicol y núcleo sensible a la temperatura y al pH.
- b) Estudiar las posibles aplicaciones de los nanogeles obtenidos, En particular el cargado de éstas nanopartículas con fármacos anticancerígenos de bajo peso molecular, y la liberación de estos en respuesta a cambios en el medio ambiente.

I.4 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Sintetizar polímeros entrecruzados de NIPAAm/EGDMA y NIPAAm/DVA mediante la técnica de polimerización por radicales libres, variando las proporciones de entrecruzante.
- b) Sintetizar nanogeles vía polimerización en emulsión sin detergente del metacrilato de polietilenglicol (PEGMAM) con geles de NIPAAm/EGDMA y NIPAAm/DVA, variando las relaciones PEGMAM/geles.
- c) Sintetizar el monómero ácido metacrililoixi-*o*-benzoico (MAOB).
- d) Sintetizar nanogeles vía polimerización en emulsión sin detergente de co-monómeros de NIPAAm/MAOB, variando las proporciones de MAOB.
- e) Evaluar a los nanogeles obtenidos mediante DLS, para estimar su tamaño y el número de distribuciones, determinar el efecto de la temperatura y el pH en el diámetro hidrodinámico y estabilidad de los nanogeles.

- f) Caracterizar la morfología y el tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica (AFM, TEM).
- g) Síntesis y caracterización de los nanogeles a gran escala.
- h) Cargar los nanogeles con los fármacos hidrofóbicos doxorubicina (básico) y 5-fluorouracilo (neutro), equilibrando las nanopartículas de una solución que contenga a los fármacos.
- i) Realizar estudios de liberación controlada de fármacos anticancerígenos, evaluando el efecto de temperatura, pH y evaluar su aplicabilidad al área biomédica.

CAPÍTULO II TEORIA GENERAL

II.1 NANOTECNOLOGIA Y NANOBIOMEDICINA

Mientras que el mundo de la nanotecnología es relativamente nuevo, la existencia de dispositivos y estructuras funcionales en dimensiones nanométricas no lo es y, en efecto, tales estructuras han existido en la tierra desde sus inicios.⁹ La nanotecnología ofrece varias estructuras del orden de una milmillonésimas de un metro; el prefijo *nano* en el mundo de la nanotecnología refiere a una milmillonésima parte (1×10^{-9}). Esta ciencia se encarga del estudio, producción, caracterización y manipulación a nivel, atómico, molecular y supramolecular a escala nanométrica (en el intervalo de 0.1 a 100 nm), para crear y utilizar las estructuras, materiales, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones atribuibles a su pequeñísimo tamaño.^{10,11} Todos los sistemas biológicos y sintéticos tienen sus primeros niveles de organización en la nanoescala (nanocristales, nanotubos y nanobiomotores), donde sus principales propiedades y funciones están bien definidas. El objetivo de la nanotecnología puede ser descrita como la habilidad de ensamblar moléculas en objetos útiles, integrados a lo largo de varias escalas de longitud y, después de utilizarlos, degradarlos a moléculas. Los rearrreglos o reorganización de la materia en la nanoescala, utiliza interacciones débiles tales como fuerzas de Van Der Waals, enlaces de hidrógeno, dipolos electrostáticos, y varias fuerzas superficiales; requieren bajo consumo de energía y permiten cambios reversibles y otros cambios subsecuentes.^{9,11}

Uno de los retos más importantes es entender los procesos intracelulares y la biología del sistema nervioso. La nanotecnología ofrece herramientas y plataformas

tecnológicas para la biomedicina, por ejemplo, la investigación en el ambiente subcelular, los procesos biológicos incluyendo el autoensamblaje, la transformación de nanobiosistemas en lugar de nanocomponentes individuales, y el desarrollo de nuevos biosensores. La ciencia de los nanobiosistemas es una de las áreas más desafiantes y de más rápido crecimiento de la; es esencial para comprender los sistemas biológicos y para desarrollar nuevas herramientas para la medicina, tales como la síntesis de nuevos principios activos y su liberación sitio específica, medicina regenerativa, etc.

La nanobiomedicina es una área que aplica los principios y técnicas de la nanoescala para entender y transformar materiales inertes y biosistemas para propósitos médicos, tales como la síntesis de un principio activo, el diseño de dispositivos para liberación controlada de fármacos, comprensión de los procesos neurológicos, reemplazo de órganos, etc. Se espera que se acelera la integración de la nanotecnología con la biomedicina, la biología, la información tecnológica y las ciencias cognoscitivas, se espera que se acelere en la próxima década.¹²

II.2 NANOSISTEMAS COMO ACARREADORES FARMACEUTICOS.

Los micro y nanosistemas sintetizados a partir de materiales orgánicos e inorgánicos, han adquirido gran interés en aplicaciones biomédicas tales como diseños de biosensores y síntesis de acarreadores o dispositivos de liberación de fármacos sitio-específico, etc. Emulsiones, suspensiones, micelas, liposomas, dendrímeros, polímeros sensibles, son algunos ejemplos de acarreadores

farmacéuticos. Estos tienen muchas ventajas sobre los sistemas convencionales, ya que liberan mejor, amplían la bioactividad del principio activo protegiéndolos de los efectos del medio ambiente biológico, muestran menos efectos secundarios, demuestran alta eficacia, y requieren menor cantidad de principio activo.¹¹ Es muy importante para un vehículo de liberación, que tenga propiedades de biocompatibilidad, que ni él ni sus productos de degradación sean tóxicos o produzcan efectos alérgicos o inflamatorios. Estos sistemas también deben proteger la actividad y estabilidad de los principios activos y mejorar el transporte a través de las membranas biológicas. Si algunas funciones específicas se incorporan al dispositivo, también podría ser posible la liberación del fármaco en un sitio específico, por ejemplo un sitio donde el sistema puede ser estimulado por señalización celular.

En el diseño y formulación de sistemas de liberación, los parámetros clave son el tamaño del dispositivo, el método de cargado, la estabilidad del fármaco, los parámetros de degradación de la matriz y la cinética de liberación del fármaco. Los nanosistemas, tienen muchas ventajas sobre los microsistemas, tales como poder circular en sangre por periodos largos de tiempo sin ser reconocidos por los macrófagos, su fácil penetración en los tejidos a través de capilares y membranas celulares, facilidad para ser captados por las células, demostrando alta eficacia terapéutica en el sitio diana, y poder sostener el efecto farmacológico en el sitio específico por un largo periodo de tiempo.

II.3 NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

El objetivo más importante para la liberación controlada de fármacos es ofrecer la máxima efectividad terapéutica, mientras disminuyen los efectos secundarios del fármaco. A este respecto los nanosistemas versátiles para la liberación de fármacos, se basan en novedosos biomateriales a partir de polímeros, los cuales han sido ampliamente estudiados para buscar ventajas en el tratamiento con el fármaco.

II.3.1 Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas han tenido una importante aplicación en la nanoescala como acarreadores para la liberación de fármacos de bajo peso molecular, proteínas, genes, etc.¹³⁻¹⁵ Las micelas son ensamblados supramoleculares de tamaño nanométrico (entre 10 y 100 nm) formados a partir de copolímeros en bloque o copolímeros injertados. Las micelas tienen una distribución de tamaños muy estrecha y se caracterizan por su arquitectura núcleo-coraza, en donde los bloques hidrofóbicos se agregan del exterior acuoso para formar un núcleo interno rodeado por una coraza de cadenas de copolímeros hidrofílicos. Una micela es termodinámicamente estable, en relación al desensamblaje de cadenas, si la concentración de copolímeros en bloque excede la concentración micelar crítica. La arquitectura núcleo-coraza de la micela polimérica es esencial por su utilidad como un novedoso material funcional para aplicaciones farmacéuticas. El núcleo de las micelas tiene un espacio para cargar agentes terapéuticos o de diagnóstico. La coraza hidrofílica tiene un cepillo como corona que estabiliza la micela en una

dispersión acuosa.¹⁶ El poli(óxido de etileno) (PEO), se utiliza frecuentemente como un bloque hidrofílico de un copolímero que forma micelas (Figura 1). Las propiedades más relevantes que se conocen de este polímero son: su alta capacidad de hidratación, alta hidrosolubilidad, no-toxicidad, no-inmunogenicidad, y funcionar como un eficiente protector estérico para diversas micropartículas tales como liposomas y nanocápsulas en medios biológicos.^{17,19}

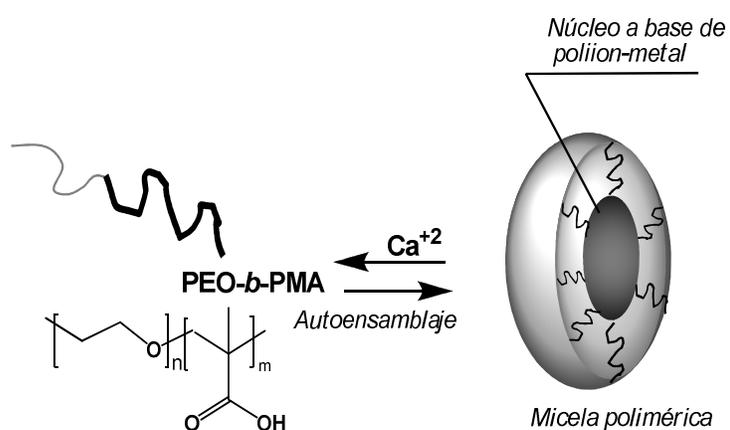
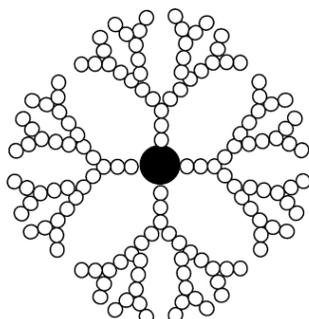


Figura 1. Micelas poliméricas formadas mediante auto ensamblaje de copolímeros: de PEO y complejos poliónicos.

II.3.2 Dendrímeros

Los dendrímeros representan una clase nueva de macromoléculas, las presentan una estructura tridimensional única en la cual una serie de ramas se extienden desde el núcleo.^{23,24} Un dendrímero típico se compone de tres características estructurales principales: Un núcleo multifuncional, un ramificado de unidades y grupos de superficie. Se ha estudiado recientemente la aplicación de dendrímeros en la administración de fármacos anticancerígenos, antivirales,

antibacterianos y agentes de contraste en resonancia magnética nuclear.^{25,26} Los



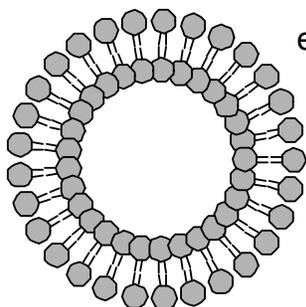
dendrimeros tienen una arquitectura única, la cual puede proveer varias ventajas para la liberación de fármacos: En primer lugar, la cavidad interna del dendrímero proporciona interacciones no covalentes con drogas hidrofóbicas para lograr la encapsulación y

obtener una liberación controlada del fármaco. En segundo lugar, la multivalencia controlada de los dendrímeros puede ser utilizada para adjuntar combinaciones de moléculas y fármacos, dirigidas a grupos de solubilización de la superficie de los dendrímeros de una manera bien definida.²⁷ En tercer lugar, la forma globular de la mayoría de los dendrímeros podría tener algún efecto en las propiedades biológicas, y la baja polidispersidad de los dendrímeros podría tener efecto en las propiedades farmacocinéticas. Los dendrímeros aplicados a la liberación de fármacos, ofrecen un protocolo uniforme y prometedor para la captura del fármaco, la conjugación y la liberación controlada.

II.3.3 Liposomas

Los liposomas están hechos principalmente de fosfolípidos, y por esta razón son altamente biocompatibles y biodegradables. Los liposomas tienen la ventaja de ser capaces de liberar macromoléculas, tales como enzimas, proteínas y material genético.²⁸ Desde el punto de vista morfológico, los sistemas liposomales pueden ser clasificados en función del número de bicapas, en unilamelares, oligolamelares, o multilamelares; en función del tamaño promedio del acarreador, en pequeñas

(<100 nm), medianas (100–500 nm) y grandes (>1µm), respectivamente. Para formular liposomas se utilizan comúnmente lecitinas, colesterol; moléculas



esteroideas, fosfolípidos cargados, gangliósidos y materiales poliméricos para modificar las propiedades en función de los requerimientos terapéuticos.²⁹ Diferentes componentes

pueden modificar la biodistribución, la carga de superficie, la liberación y la velocidad de aclareamiento del fármaco liberado del sistema liposomal.^{29,30} El tiempo de vida media en circulación de un liposoma, puede

verse alterado por la carga de su superficie, la cual puede influir en la farmacocinética del sistema.³¹ Un aspecto importante en la aplicación de los liposomas como sistemas de liberación de fármacos, es la posibilidad de lograr una liberación disparada del fármaco a partir del acarreador en respuesta a ciertos estímulos, como la temperatura y el pH.

II.3.4 Nanogeles

El término “nanogel” define a las dispersiones acuosas de partículas a base de hidrogeles formadas física o químicamente por redes de entrecruzantes poliméricos, a escala nanométrica.²⁰ El término nanogel (NanoGel™) fue introducido por Alexander V. Kabanov y Serguei V. Vinogradov para definir redes bifuncionales entrecruzadas de un polión y de un polímero no iónico para la liberación de polinucleótidos [polietiliminina (PEI) y polietilenglicol (PEG) o PEG-cl-PEI]. Algunos otros estudios describieron a los nanogeles como nanopartículas de

hidrogeles poliméricos, por ejemplo Akiyoshi y Sunamoto propusieron agregados nanométricos hinchados de colesterol modificado para la liberación de insulina.²¹ Jung Kwon Oha y colaboradores²² definieron a los nanogeles como partículas poliméricas entrecruzadas las cuales pueden ser consideradas como hidrogeles si éstas son solubles en agua y si poseen gran contenido de agua, para formar cadenas poliméricas hinchables, si son biocompatibles y si tienen propiedades mecánicas. Los nanogeles ofrecen ventajas como sistemas poliméricos de liberación de fármacos: un tamaño ajustable de nanómetros a micrómetros, una gran superficie para bioconjugación polivalente, y una red interior para la incorporación de las biomoléculas y fármacos (Figura 2).²²

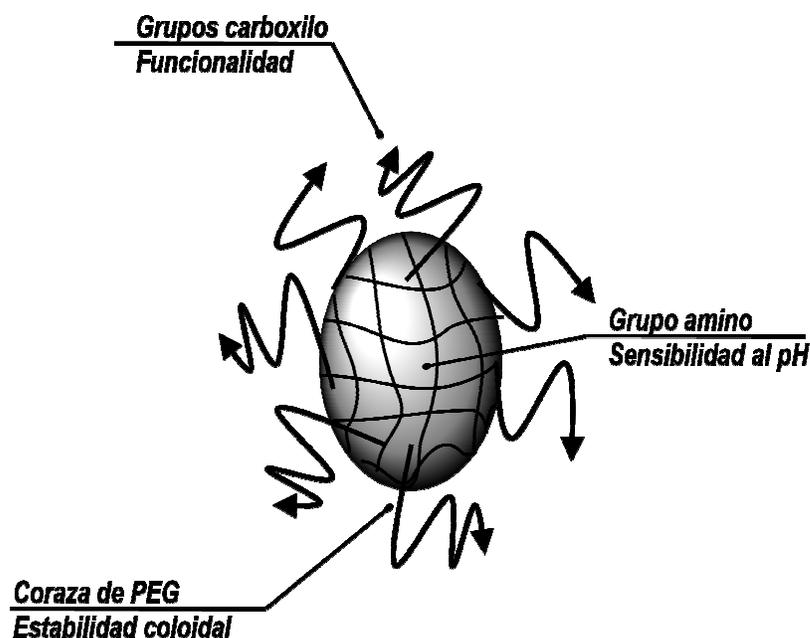


Figura 2. Nanogel con coraza de PEG funcionalizado con grupos carboxilo sensibles al pH.

En general los nanogeles representan una familia novedosa de materiales dentro de la escala nanométrica para aplicaciones en la liberación de fármacos, genes y un sin fin de agentes. Las publicaciones del área farmacéutica y la nanomedicina relacionadas con los nanogeles, se incrementaron notablemente a partir del año 2002. Esto demostró su aumento en el interés de los nanogeles como biomateriales para su aplicación en el área farmacéutica. Los nanogeles son materiales muy prometedores como sistemas de liberación de fármacos ya que presenta una alta capacidad para cargar fármacos.²⁰

II.4 DESARROLLO DE NANOGELES PARA APLICACIONES BIOMEDICAS

El diseño y la preparación de hidrogeles tienen gran interés en la ingeniería biomédica, las aplicaciones farmacéuticas en la liberación de fármacos y en las ciencias de biomateriales, ya que presentan estructuras químicas en tres dimensiones, excelentes propiedades mecánicas, alto contenido de agua y una alta biocompatibilidad.³ Se requieren diversos criterios para diseñar y desarrollar nanogeles para aplicaciones *in vivo*. Un criterio es la estabilidad de los nanogeles en la circulación sanguínea; ésto es importante porque la inestabilidad podría generar la liberación prematura de los fármacos causando efectos adversos. Otro criterio es la bioconjugación de la superficie de los nanogeles con ligandos específicos que pueden reconocer receptores de células dañadas; estos ligandos para células cancerígenas incluyen a derivados del ácido fólico, péptidos, proteínas y anticuerpos.³²⁻³⁴ Otro criterio es el control sobre las dimensiones menores a 200 nm

de diámetro; lo que facilita la entrada de los nanogeles a la célula por endocitosis y endocitosis mediada por receptor, e impide su detección por el sistema inmunológico.³⁵ El último criterio es la biodegradabilidad de los nanogeles; la biodegradación no sólo modula la liberación del fármaco, si no que también permite la eliminación del dispositivo vacío después de la liberación del fármaco. Se han desarrollado diversos entrecruzantes funcionalizados con uniones biodegradables, éstos incluyen péptidos³⁶, anhídridos³⁷, oligolactatos³⁸, poliperóxidos³⁹, disulfuros⁴⁰, acetales⁴¹ y polifosfoésteres⁴². Existen varias estrategias sintéticas para la preparación de los nanogeles, entre las cuales se incluyen los métodos fotolitográficos, el micromolde, la modificación de biopolímeros, la polimerización heterogénea por radicales libres y la polimerización radicalica controlada.³

II.4.1 Polimerización heterogénea por radicales libres

El proceso de polimerización heterogénea (formación de partículas) es un sistema de dos fases en el cual el monómero y/o el polímero forman una fina dispersión en un líquido inmiscible y el iniciador de la polimerización puede ser soluble en el monómero (fase dispersa) o en el medio de polimerización (fase continua). Además del monómero, el medio de polimerización y el iniciador, también se pueden agregar uno o más aditivos a la mezcla de reacción para emulsificar al monómero y/o estabilizar las partículas poliméricas que se van formando. Varias combinaciones de estos métodos se han empleado para producir partículas poliméricas esféricas o con superficies irregulares y con distribuciones estrechas de

tamaños, desde los 50 nm hasta 1 μm . Entre los métodos de polimerización homogénea por radicales libres⁴³ se incluye a: la polimerización en suspensión, polimerización en dispersión, polimerización en emulsión, la polimerización en emulsión sin detergente, la polimerización núcleo-coraza, la polimerización por precipitación, la polimerización en miniemulsión inversa y la microemulsión inversa (Figura 3), Todos estos métodos se distinguen y se diferencian por los siguientes criterios:

- 1) Estado inicial de la mezcla de polimerización.
- 2) Cinética de polimerización
- 3) Mecanismo de la formación de las partículas
- 4) La forma y tamaño de las partículas formadas

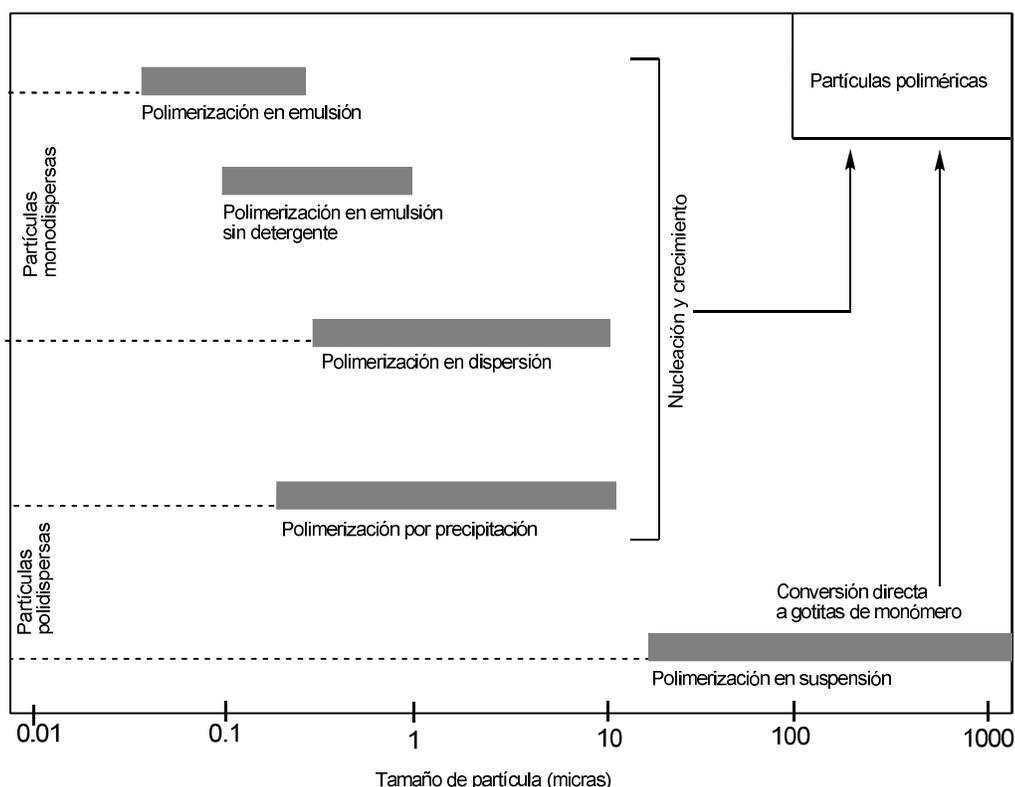


Figura 3. Características de la cinética e intervalo de tamaños de las partículas poliméricas producidas por diferentes métodos de polimerización heterogénea.

II.4.1.1 Polimerización en suspensión

En el método de polimerización en suspensión, el iniciador es soluble en el monómero y estos son insolubles en el medio de polimerización. La relación de volumen entre la fase dispersa y la fase continua se mantiene entre 0.1-0.5, pero en principio puede ser tan alta como la unidad o incluso más. En este método, la fase dispersa es suspendida en el medio en forma de pequeñas gotas (microgotas) por medio de un agitador y un agente estabilizador. La polimerización se inicia a temperaturas entre 20 y 100°C, completándose la reacción al 100%. Bajo estas

condiciones, el monómero es convertido directamente a las correspondientes microesferas de aproximadamente 10 a 1000 μm .⁴³

II.4.1.2 Polimerización en dispersión

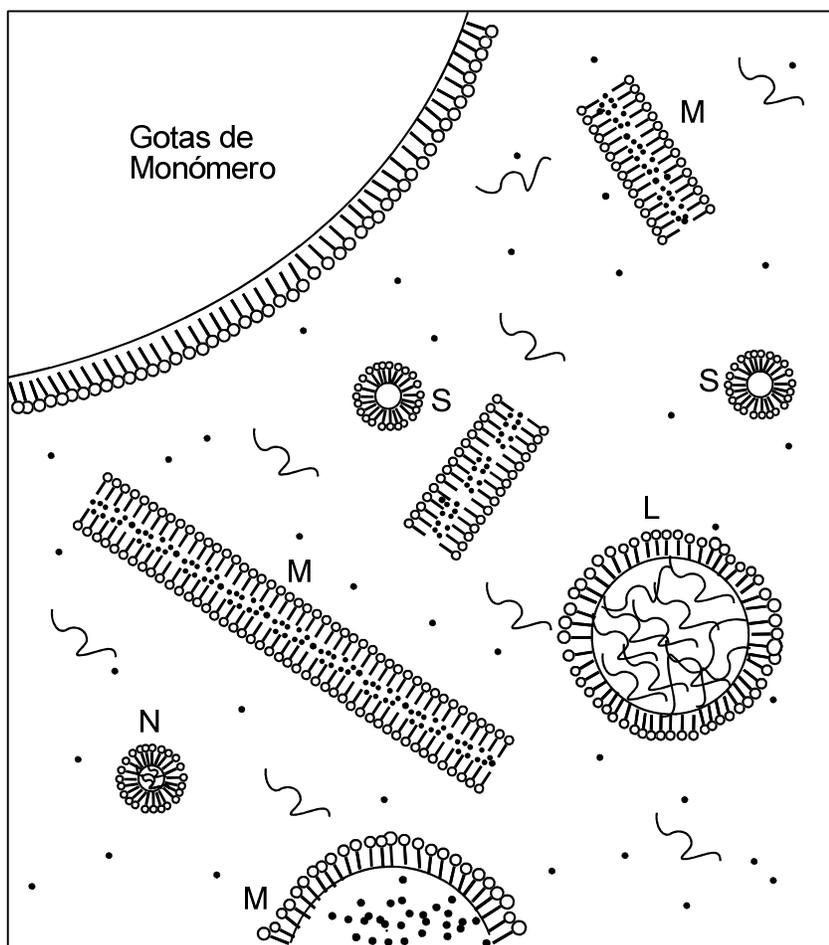
La polimerización en dispersión es una técnica que permite la preparación de partículas en la escala micrométrica y con distribuciones estrechas de tamaños. Para la reacción de polimerización en dispersión se incluyen ingredientes como el monómero y el iniciador solubles en la fase continua compuesta por disolventes orgánicos. Al inicio de la polimerización, la mezcla de reacción es homogénea, sin embargo, los polímeros formados, al ser insolubles en el medio continuo, conducen a la formación de una dispersión de partículas poliméricas que se estabilizan con la ayuda de estabilizadores coloidales.^{43,44} Dependiendo de la solubilidad en el medio, puede ocurrir una separación de fases en las primeras etapas de la reacción para obtener microradicales y macromoléculas; esto permite la nucleación y la formación de partículas primarias. Por lo tanto, las partículas primarias formadas en la reacción de polimerización en dispersión se hinchan por el medio de polimerización y/o por el monómero. Como resultado de la polimerización en dispersión se obtienen partículas esféricas cuyos diámetros oscilan entre en un intervalo de 0.1 a 10 μm .

II.4.1.2 Polimerización en emulsión

En una polimerización en emulsión, el monómero es insoluble en la fase continua, pero ocurre la emulsificación por medio de un tensoactivo o detergente. El iniciador es soluble en el medio, pero no en la fase dispersa. Bajo estas

condiciones, el monómero está presente parcialmente en la mezcla en forma de gotas de aproximadamente 1 a 10 μ m de longitud, aunque un porcentaje pequeño del monómero se disuelve también parcialmente en el medio; y parcialmente en forma de micelas cubiertas de detergente (ca.50-100 Angstroms $^{\circ}$) dependiendo de la concentración del emulsificante. La relación de volumen entre las fases, por lo general es de 0.1-0.5 y la polimerización se lleva a cabo entre 40 a 80 $^{\circ}$ C. La mezcla para la polimerización en la fase inicial de la emulsión se presenta en la Figura 4.

Desde el momento que se adiciona el iniciador al medio, se inicia la polimerización (es decir, fuera de las gotas y micelas). Los radicales formados en el medio de polimerización son rodeados por el monómero disuelto y las moléculas de emulsificante, o son absorbidos por las micelas de monómero recubiertas de detergente. Los detalles exactos de la formación y el crecimiento de las partículas dependen en gran medida de la mezcla de polimerización⁴⁵. El tamaño de partícula del látex está regularmente en el intervalo de 50 a 300 nm.⁴³



- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| ●= Monómero | M= Micelas que contienen monómeros |
| S= Micelas de detergente | ~ Macrorradicales en crecimiento |
| N= Núcleo polimérico | L= Látex en crecimiento |

Figura 4. Esquema de la primera fase de la polimerización en emulsión.

En un sistema de polimerización en emulsión, uno de los principales problemas es la contaminación superficial por emulsificantes, tales como tensoactivos o detergentes, siendo extremadamente difícil su remoción, ya que los emulsificantes están incorporados sólidamente en el núcleo de las emulsiones.⁴⁶

II.4.1.3 Polimerización en emulsión sin detergente

La polimerización en emulsión sin detergente, es una polimerización en emulsión pero sin utilizar tensoactivos. Se piensa que el método se desarrolla en cuatro etapas (Figura 5): durante de la primera etapa, el medio de polimerización es acuoso, donde uno de los monómeros es soluble en el medio y el otro monómero es hidrofóbico, el cual forma la fase dispersa; en la segunda etapa, el monómero hidrofóbico es inicialmente polimerizado, posteriormente comienzan a crecer cadenas de segmentos hidrofóbicos dependiendo del radio de reactividad entre el monómero hidrofóbico y el monómero hidrofílico en el medio acuoso. En la tercera etapa, los radicales del polímero se estabilizan por la formación de micelas de autoensamblaje en agua, después del crecimiento del peso molecular debido a la selectividad y miscibilidad, donde las cadenas hidrofóbicas activadas son recogidas en el núcleo y las cadenas hidrofóbicas emanan del núcleo. En la última fase, la polimerización procede dentro del núcleo de las micelas. Por lo tanto se pueden obtener microesferas poliméricas con tamaños de distribución desde los 100 nm hasta 1 μ m.⁴⁶ En la polimerización en emulsión sin detergente, la estabilidad de las microgotas de monómero dependen de la absorción de las moléculas del iniciador (incluyendo los iones) o del monómero hidrofílico. El efecto estabilizante de estas especies podría ser débil, sin embargo a la temperatura de polimerización (40-80°C), la situación puede cambiar, porque tanto las reacciones en la fase acuosa y la interfase, podría proporcionar suficiente emulsificación para estabilizar las microgotas. La reacción en la interfase podría ser más importante para la formación

de las partículas, porque el oligómero generado en la interfase podría actuar como núcleo para la condensación del monómero hidrofóbico, formando un aérea supersaturada. Por consiguiente, la velocidad de generación de las partículas es relativa a la velocidad de reacción en la interfase, la cual es determinada por la concentración del iniciador en la misma.⁴⁷

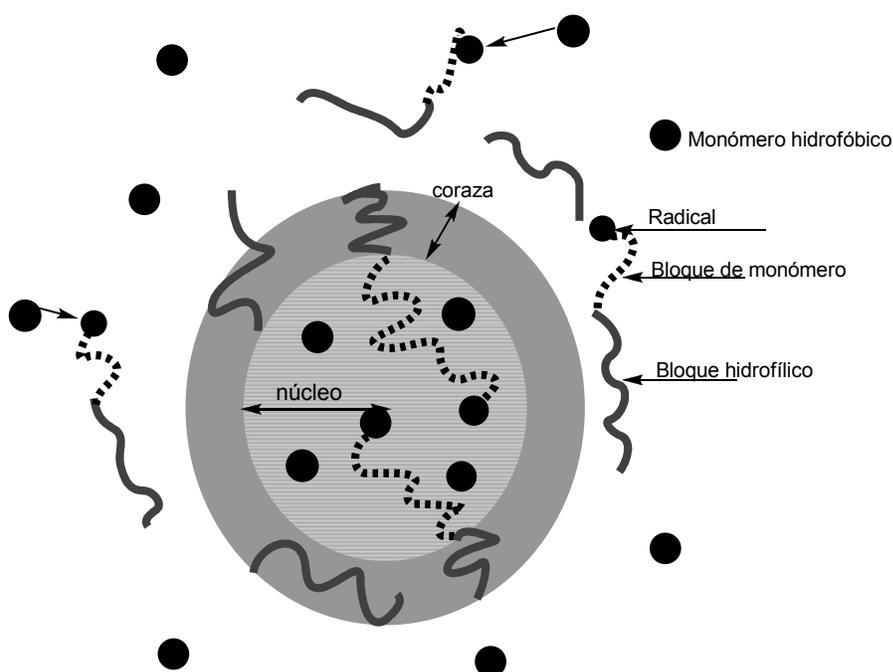


Figura 5. Esquema de la polimerización en emulsión sin detergente.

En comparación con los sistemas de polimerización en emulsión, la superficie de la emulsión sin detergente está completamente limpia por no utilizar emulsificantes. Además, la superficie se puede modificar químicamente, exponiendo

diversos grupos funcionales, por lo que este método es de interés, especialmente en ingeniería biomédica y aplicaciones farmacéuticas.^{48,49}

II.4.1.4 Polimerización núcleo-coraza

La formación de partículas núcleo-coraza por polimerización heterogénea es superficialmente similar a la polimerización en emulsión. Para la formación de la coraza alrededor de un núcleo por polimerización directa, se deben tomar estrictamente las siguientes condiciones de polimerización:

- 1) Las partículas del núcleo no deben hincharse en el monómero;
- 2) La coraza de las partículas deben formarse o precipitarse en la superficie del núcleo;
- 3) Los segmentos del núcleo y de la coraza no deben difundirse unos con otros (deben ser inmiscibles).

Una estructura núcleo-coraza ideal puede obtenerse al unir cadenas de polímero preformadas en la superficie del núcleo. El proceso de formación núcleo-coraza es complicado, y depende de los detalles exactos de las condiciones experimentales, tales como la difusión del monómero en las semillas y la miscibilidad de los dos polímeros.^{43,50} La coraza hidrofílica es como una coraza que estabiliza las partículas en una dispersión acuosa; la arquitectura núcleo-coraza de las partículas poliméricas es esencial para utilizarla como un material funcional novedoso en

aplicaciones farmacéuticas, ya que el núcleo de las partículas es un espacio de carga para diferentes agentes terapéuticos y de diagnóstico.¹

II.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS.

Los nanogeles pueden ser caracterizados por sus propiedades físico-químicas, como el tamaño, número de distribuciones, cargas superficiales y morfología. Para la medición del tamaño de partícula, se utilizan comúnmente dos técnicas: Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Difracción de Láser (LD).⁵¹ La Dispersión de Luz Dinámica, también conocida como Espectroscopia de Fotocorrelación (PCS), mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz cuando es dispersada por el movimiento de las partículas (Figura 6). Las fluctuaciones en la dispersión de la luz, son el resultado del movimiento browniano de las partículas y su velocidad puede ser correlacionada al tamaño de las partículas. La DLS analiza estas fluctuaciones de intensidad a una escala en el orden de nano, micro y milisegundos, obteniéndose el coeficiente de difusión (D), y posteriormente el diámetro hidrodinámico (Dh). El intervalo de diámetro de las partículas que se puede medir por DLS, va desde 1nm hasta 3mm.⁵¹

Otra técnica es la Difracción de Láser (LD), que se basa en la relación entre el ángulo de difracción y el radio de las partículas, a menor tamaño de partícula, mayor dispersión de luz. En general es recomendable utilizar las dos técnicas simultáneamente para obtener datos más precisos; sin embargo, se debe mantener

en mente que ambas técnicas DLS y LD no miden el tamaño de partícula directamente, sólo correlacionan la dispersión de la luz con el tamaño de partícula.

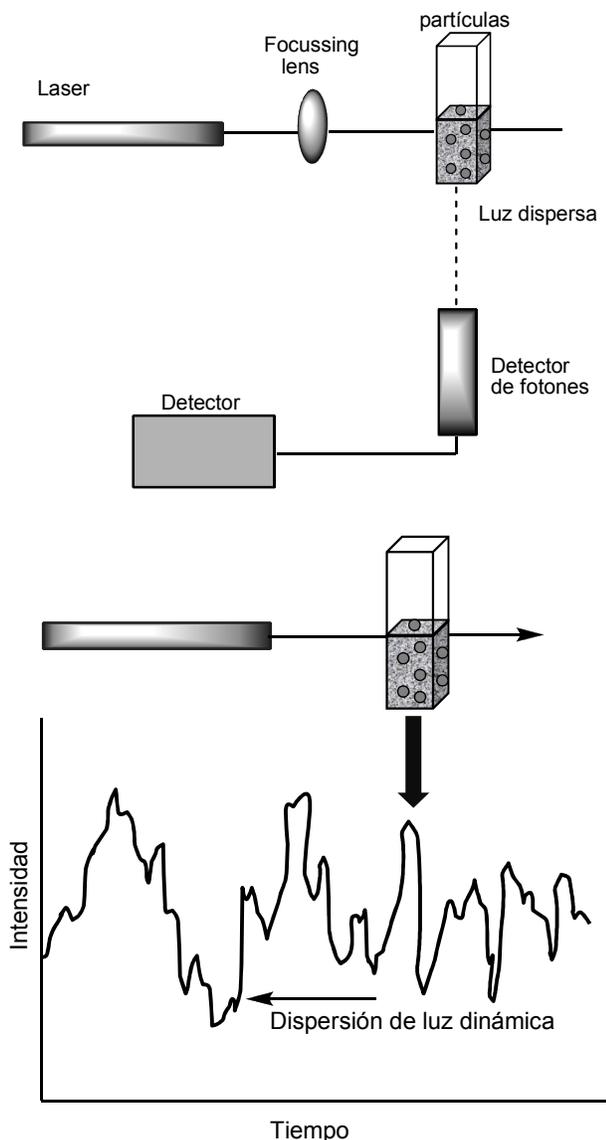


Figura 6. Diagrama de la función de un instrumento convencional de dispersión de luz dinámica (DLS).

Para obtener información directa del tamaño de partícula y la forma de la partícula, se utiliza la Microscopía Electrónica (EM). Con la microscopía se puede

obtener información estructural que se dispersa por electrones; las técnicas de EM más comúnmente utilizadas son la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). La AFM se basa en las fuerzas interactivas entre una superficie y una punta de sondeo que permite la proyección de la imagen de la partícula. Esta técnica tiene ventajas, es muy sencilla la preparación de la muestra, se pueden utilizar muestras fluidas, por lo que es posible llevar a cabo el análisis directamente en las muestras hidratadas.^{51,52}

La determinación del potencial Z (Figura 7), se utiliza para predecir la estabilidad de almacenamiento de las dispersiones coloidales.⁵³ En general, a mayor valor del potencial zeta de nanopartículas, mayor será la estabilidad de la dispersión coloidal debido al efecto de repulsión de cargas entre las nanopartículas.

La estabilidad coloidal de una dispersión es la resistencia a la floculación o agregación de las partículas y resulta en una vida media larga; esto depende del balance de repulsiones o atracciones de las cargas que existen entre las partículas. Si las partículas tienen una mutua repulsión entonces la dispersión será estable. Si las partículas tienen poca o ninguna fuerza de repulsión entonces se presenta un mecanismo de inestabilidad, ej. Agregación, floculación, etc.

Las características superficiales también son importantes para la interacción de los acarreadores coloidales con los sistemas biológicos *in vivo*. La caracterización del estado físico de los acarreadores coloidales (principalmente de vesículas y nanopartículas a base de lípidos), puede ser realizado eficientemente por dos técnicas, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y difracción de rayos

X. El método por DSC se basa en el hecho de que diferentes materiales poliméricos poseen diferentes puntos de fusión y diferentes entalpías de fusión y los cambios en los parámetros termotrópicos de los sistemas son una evidencia de diferentes arreglos espontáneos y/o inducidos.

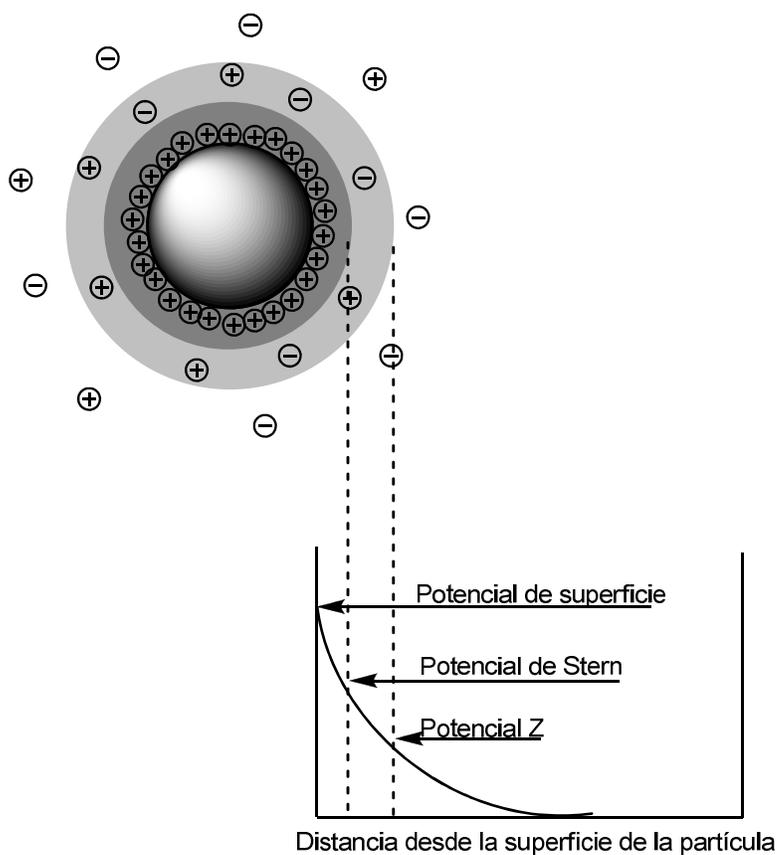


Figura 7. Potencial Z. La primera capa del líquido rodeada de partículas, se divide en dos partes: Una región interna (capa de Stern) donde los iones se encuentran fuertemente unidos y otra región externa (capa difusa) donde la interacción entre los iones es menos fuerte.

La técnica de rayos X permite la caracterización de las formas poliméricas y la determinación de los espacios grandes y pequeños en una matriz, por ejemplo la rejilla de un lípido o un lípido sólido en las nanopartículas.^{54,55} La ventaja de estas dos técnicas es la posibilidad de analizar partículas en suspensión sin la necesidad de secarlas o liberarlas del disolvente, para evitar posibles modificaciones en la estructura del dispositivo.⁵¹

II.7 CARGADO DE NANOGELES CON FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS

Existen diferentes estrategias para la incorporación de fármacos y agentes biológicos dentro de los nanogeles; una de las propiedades más importantes para este fin, es el hinchamiento de los nanogeles. Por otra parte, se han estudiado diversos métodos para el cargado; por atrapamiento físico, conjugación covalente y autoensamblaje controlado.

En el método por atrapamiento físico,⁵⁶ la sustancia activa se pone en contacto con el monómero y con el entrecruzante antes de la síntesis del gel, de manera que a medida que se forma la red, el fármaco queda atrapado en los poros de la misma. Esta técnica requiere que el tamaño del poro sea menor que el fármaco para evitar que se salga del gel. El atrapamiento físico de fármacos se ha logrado con la complejación de cadenas de dextranos con poli-*L*-láctidos y poli-*D*-láctidos en nanogeles monodispersos biodegradables con tamaños de partícula de 70 nm⁵⁷. La Doxorubicina también se ha cargado en nanogeles entrecruzados con grupos

anfífilos, a base de plurónico F127⁵⁸ o poli[oligo(óxido de etileno)metilmetacrilato]. Se ha demostrado que el cargado a base de interacciones hidrofóbicas reduce la capacidad de cargado.⁵⁹ En el método por conjugación covalente, la sustancia activa puede ser conjugada con un grupo vinílico y después se pone en contacto con el agente entrecruzante, de modo que el fármaco actúa como un monómero más, formando parte de la red, y así queda inmovilizada. La actividad del fármaco se conserva casi íntegra después de la reacción.⁵⁶

Un ejemplo de conjugación covalente es el cargado de cisplatino en nanogeles de PEG-b-PMA.⁶⁰⁻⁶¹ Tales nanogeles contienen un núcleo poliiónico entrecruzado con PMA y un polímero hidrofílico (PEG) en la coraza del nanogel; en solución acuosa el cisplatino reacciona con los grupos carboxílicos del núcleo, lo cual permite el colapso del fármaco para cargarse en el núcleo. Alternativamente se han utilizado nanogeles de poliacrilamida para incorporar quimioproteína, copolimerizando por microemulsión inversa.⁶² Estos nanogeles contienen a la proteína unida covalentemente, pudiendo incrementar la termoestabilidad y la vida media de la proteína.⁶³

Otro enfoque diferente se basa en el autoensamblaje controlado de nanogeles a base de polielectrolitos con cargas opuestas a los solutos, el cual puede producir nanomateriales con alta capacidad para cargar agentes biológicos.⁶⁴

Por otra parte, el hinchamiento y el colapso de los nanogeles son las únicas propiedades para optimizar el cargado y la liberación de fármacos. El hinchamiento de los nanogeles en medios acuosos, es controlado por la estructura del nanogel (la

estructura química del polímero, el grado de entrecruzamiento y la densidad de carga en los geles a base de polielectrolitos) y por parámetros ambientales, como el pH, la fuerza iónica, y la naturaleza química de los iones de bajo peso molecular, para polielectrolitos; así como la respuesta de los nanogeles a la temperatura (Figura 8). Es importante saber que un balance entre la presión osmótica y la elasticidad del polímero determina las dimensiones físicas de un nanogel.⁶⁵

La presión osmótica de los nanogeles a base de polielectrolitos resulta de una diferencia de concentraciones de iones móviles entre el interior de los nanogeles y el exterior (en la solución). Los grupos ionizables atraen contra-iones hidratados; esto favorece el hinchamiento del nanogel, mientras que la entropía de elasticidad de las cadenas poliméricas se interpone en la expansión. La ionización de los nanogeles a base de poli-electrolitos ácidos, dependen del pH. La reducción en el total de las cargas, el número de contraiones y un cambio en el pH, resulta en una compresión del nanogel, (por la reducción de la presión osmótica) hasta que el volumen excluido de las cadenas poliméricas limita una mayor compresión. El hinchamiento de los nanogeles a base de polielectrolitos depende también de la fuerza iónica. Por ejemplo, a mayor fuerza iónica el hinchamiento de nanogeles catiónicos a base de PAETMAC se da por la concentración del entrecruzante, mientras que a menor fuerza iónica, el hinchamiento es influido por el entrecruzante y la concentración de las cargas.⁶⁶ En algunos casos, las interacciones entre el disolvente y las cadenas poliméricas de los nanogeles dependen de la temperatura, permitiendo el hinchamiento o el colapso de los nanogeles. Por ejemplo, puesto que las cadenas

de PPG en polímeros plurónicos exhiben una LCST, los nanogeles a base de plurónico son sensibles a la temperatura. Por ejemplo, se ha demostrado que nanogeles pequeños de 120 nm, presentan un hinchamiento drástico hasta 400 nm por medio de un descenso de la temperatura por debajo de la LCST.⁶⁷ También se ha observado el hinchamiento por efecto de la temperatura, en nanogeles a base de copolímeros de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).⁶⁸ Esta propiedad puede ser utilizada para diseñar sistemas para cargar fármacos sensibles a estímulos. Una de las ventajas de la alta dispersión de los nanogeles es que responden muy rápido al cambio de las condiciones ambientales,⁶⁹ las cuales facilitan la incorporación y la liberación de agentes biológicos en aplicaciones farmacéuticas. En contraste, el equilibrio de hinchamiento para los macrogeles, requiere de periodos largos de tiempo, en el orden de días. El hinchamiento y el colapso de los nanogeles son propiedades únicas para optimizar el cargado de fármacos y su respectiva liberación.¹

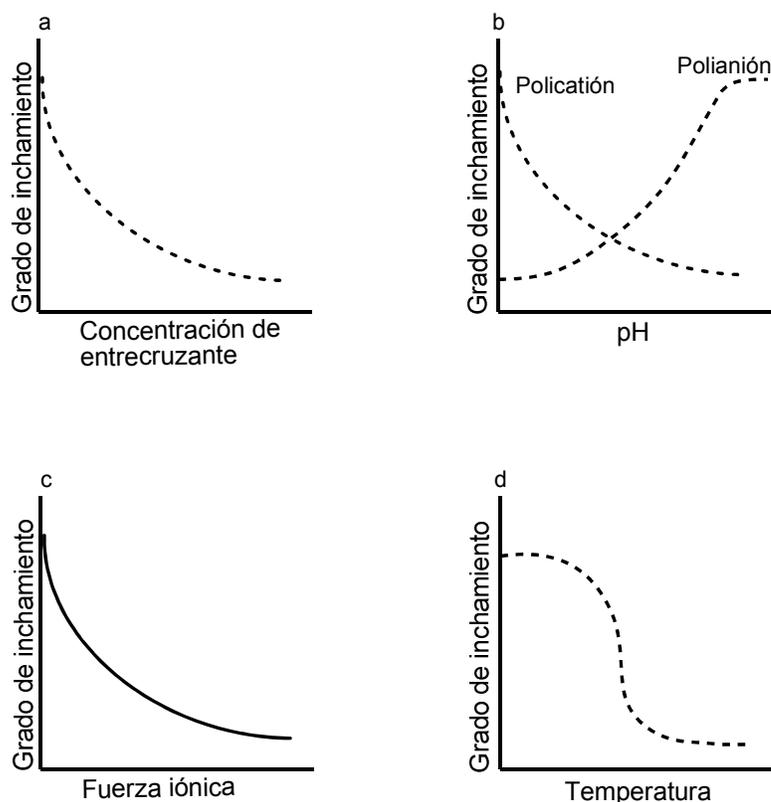


Figura 8. Factores que afectan el hinchamiento de los nanogeles. a) Un aumento en la concentración del entrecruzante, disminuye el grado de hinchamiento. b) Un incremento en el pH, resulta un colapso de nanogeles con cadenas compuestas por poliacidos débiles. c) Un aumento en la fuerza iónica, disminuye el grado de hinchamiento en nanogeles a base de polielectrolitos. d) Nanogeles a base de polímeros con LCST colapsan al aumentar la temperatura por arriba de la LCST.

II.6 PRINCIPIOS DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS EN NANOGELES.

El control de los fármacos administrados en el cuerpo humano, mejora la eficacia de la terapia médica y permite nuevos tratamientos farmacológicos. Se han logrado patrones bien definidos de liberación sostenida de fármacos, los cuales mantienen niveles del fármaco en el cuerpo humano sin inducir efectos secundarios. Sin embargo el tratamiento de tumores, el control del dolor y terapias para

infecciones, requieren una liberación pulsátil, con la finalidad de obtener óptimos efectos terapéuticos óptimos.⁷⁰

Los agentes biológicos y los fármacos pueden liberarse de los nanogeles a través de: 1) Difusión simple, 2) Degradación del nanogel, 3) Cambios del pH, 4) Desplazamiento por el contrario-iones presentes en el medio, y 5) Transición inducida por una fuente externa de energía (Figura 9). Un ejemplo de liberación por difusión, es la liberación controlada de DOX a partir de nanogeles plurónicos.⁷¹ También se han desarrollado nanogeles que pueden liberar agentes terapéuticos, en respuesta al ambiente del sitio de la enfermedad; por ejemplo, un nanogel de acrilamida con entrecruzantes a base de acetales es estable al pH fisiológico (7.4), pero se degrada a pH 5, liberando su proteína encapsulada.⁷²

Los nanogeles a base de polielectrolitos que incorporan agentes biológicos a través de enlaces electrostáticos, pueden liberar los agentes biológicos en respuesta a cambios del medio ambiente. Por ejemplo, los nanogeles de PAA, sensibles al pH, pueden liberar una carga opuesta de la proteína en el sitio del tumor o con la acidificación de los endosomas.⁷³

En resumen, la combinación de los métodos presentados en la Figura 7, pueden proporcionar un medio muy útil para el control de las características de cargado-liberación. En el caso de una micela polimérica, la liberación del fármaco es controlada por dos factores,⁹² el primero es la fuerza de enlace del fármaco en el núcleo de la micela; el segundo es la unión de las cadenas poliméricas en las

micelas entre sí, caracterizadas por la CMC. Ambos factores son considerados en términos de la estabilidad termodinámica y la estabilidad cinética.^{88,93}

El tamaño tan pequeño de las micelas, no suele ser una limitante en la velocidad de difusión del fármaco (al menos para los medicamentos de bajo peso molecular). Como resultado, se relaciona la estabilidad termodinámica con la cinética del fármaco-micela; esto es, entre más fuerte sea el enlace, más lenta será la liberación. Como una regla general, las micelas poliméricas, son menos estables que los liposomas y nanopartículas hechas a base de polímeros degradables y, por lo tanto, la velocidad de liberación de las micelas es más rápida. Los nanogel proporcionan los medios para mejorar en eficiencia de este tipo de sistemas de liberación. Por ejemplo, la liberación del fármaco puede decrecer por las cadenas de entrecruzante del nanogel, se puede ajustar y hacerlo sensible a cambios del medio ambiente o como sea requerido. Los nanogel hidrofílicos se hinchan mientras se libera el fármaco. Así mismo, el nanogel debe sostener la liberación del fármaco desde sus capas internas; esto puede ser utilizado para modificar o eliminar la liberación o incluso para alcanzar la cinética de orden cero del fármaco liberado al sitio deseado.^{74,94}

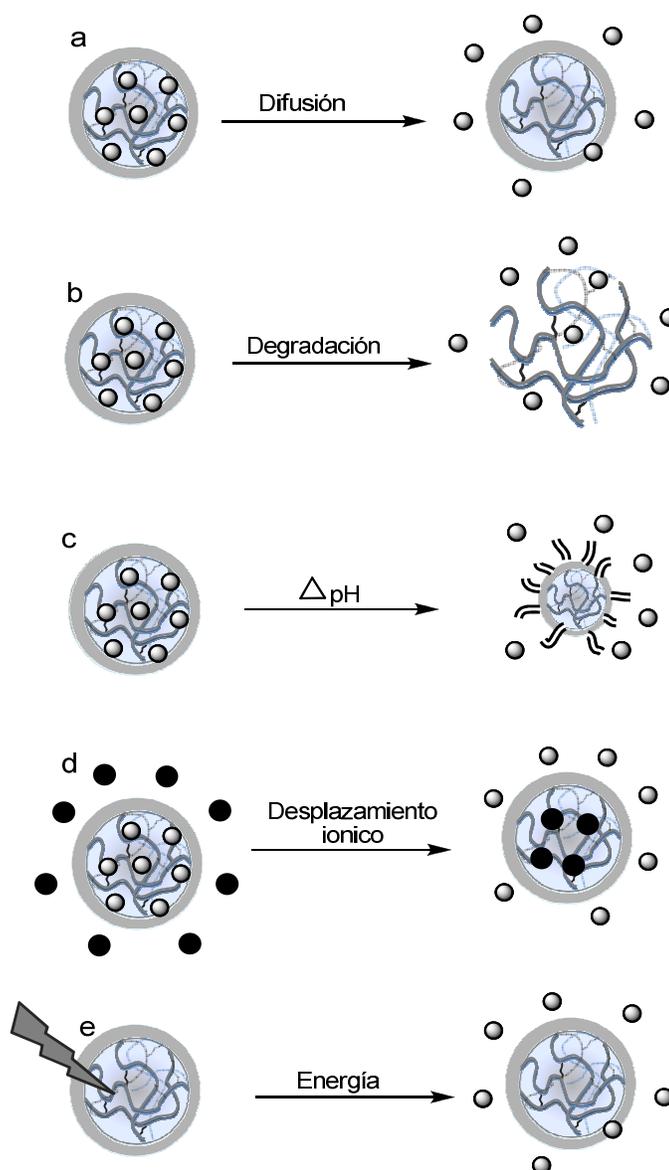


Figura 9. Liberación de fármacos a partir de nanogeles. a) Difusión del fármaco a partir de nanogeles. b) Liberación de fármacos a través de la degradación de las cadenas del entrecruzante biodegradable. c) Un cambio en el pH promueve una desionización de la red polimérica y la liberación de los enlaces electrostáticos entre el nanogel y el fármaco. d) Cationes Multivalentes de bajo peso molecular o poliiones de carga positiva o negativa, pueden desplazar a los fármacos con carga similar a partir del complejo electrostático con un nanogel iónico. e) Liberación del fármaco por la aplicación de energía externa a los nanogeles, la cual induce la degradación o transición estructural de las cadenas poliméricas del nanogel.

**CAPÍTULO III
EXPERIMENTAL**

III.1. GENERALIDADES

Equipos y Reactivos utilizados

a) Equipos

1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC).

El equipo HPLC utilizado es de la marca Pekín Elmer 200 series. Consta de una columna de separación de lecho mezclado conectada en serie, (Supelco LC18 linear, tamaño 5 μm x 25cm x 4.6 ID), Detector de UV- VIS (Varian Prestar, LC295). Software Turbocrom Navigator para HPLC Advanced LC Sampler Processor ISS200.

2. Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H -RMN)

El equipo utilizado fue un Varian Mercury NMR200 de 200 MHz. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente y se utilizó CDCl_3 como disolvente.

3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se utilizó el equipo TA instruments, MDSC2920 modulado.

4. Espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

El equipo utilizado de IR es de la marca Pekín Elmer, modelo 1600 series FT-IR: Número de barridos: 8, de 4000 a 450 cm^{-1} , resolución 4, intervalo de 2.0 cm^{-1} , los análisis se realizaron en películas en pastillas de NaCl con dispersión en diclorometano.

5. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Equipo ZetaSizer Nano-ZS series, de marca Malvern Instruments, modelo ZEN3500 con láser verde de 532 nm. Para evaluar la LCST se midió el Dh de los nanogeles y la intensidad de la luz en función de la temperatura desde 20°C hasta 50°C en solución (10µl/1ml) con agua destilada y filtrada con filtro de 0.2 µm de diámetro de poro.

6. Equipo de filtración.

Para todos los experimentos de síntesis y analíticos, se utilizó el equipo de filtración con membrana millipore Superlco, Life Sciences GHP Acrodisc 25 mm Syringe Filter 0.2 µm, filtros Suport-100 0.2 µm 47 mm PN60310

7. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible

UV-Visible spectrophotometer Beckman Coulter DU520 .

8. Potenciómetro

Se utilizó un medidor de pH 430 Corning, para realizar las titulaciones y preparar soluciones reguladoras de diferentes pH.

9. Rotaevaporador

Se utilizó un destilador de solventes a presión reducida (Rotaevaporador) HAAKE Buchler, Inc.

10. Purificador de agua

Equipo purificador de agua desionizada Barnstead Sybron, modelo D2604, en todos los experimentos y caracterizaciones se utilizó agua desionizada y filtrada con filtros de 0.2µm de diámetro de poro.

11. Recirculador

Se utilizaron dos recirculadores, uno fue de la marca Cole Parmer Polustat modelo 12101-10 y el otro de la marca LAUDA ecoline RE106.

12. Baño María.

El equipo de baño con control de temperatura es de la marca VWR International Shel Lab modelo 1217.

13. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA.

14. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

La caracterización de los nanogeles por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), fue realizada en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM campus Ensenada B.C. por el Dr. Eder Lugo Medina.

15. Sistema liofilizador

Se utilizó el equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, de 60 ciclos.

b) Reactivos y disolventes

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

- 3,9-Divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DVA)
- 5-Fluorouracilo (5-FU)

- Acetatato de sodio
- Acetato de uranilo 1%
- Acido Clorhídrico, 37.4% (Fermont)
- Ácido salicílico
- Agua destilada (Arrowhead)
- Anhídrido metacrílico (Polysicences Inc.): purificado por destilación a 90°C con hidroquinona.
- Bicarbonato de sodio
- Carbonato de sodio
- Cloroformo deuterado 99.8% (CDCl₃)(Acros Organics)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Dimetilacetamida (DMA)
- Dimetilaminopiridina (DMPA)
- Doxorubicina (DOX)
- Éter de petróleo (Fermont)
- Éter etílico (Fermont)
- Etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) (Acros Organics)
- Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄.H₂O)
- Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄.H₂O)
- Hexano (Fermont)
- Hidróxido de sodio (NaOH)

- Metanol (Fermont)
- N-Isopropilacrilamida (NIPAAm), purificada por recristalización con hexano.
- Persulfato de amonio (APS)
- Polietilenglicol metiléter metacrilato (PEGMAM)
- Sulfato de magnesio anhidro, 99% ($MgSO_4$)
- Tetrahidrofurano (THF) (Spectrum)
- Trietilamina (TEA)

c) Gases

Nitrógeno y Argón grado ultra alta pureza (UHP), de INFRA S.A. de C.V.

Los experimentos de síntesis fueron realizados en el Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana, B.C.

RMN de 1H 200 MHz. por el Dr. Adrian Ochoa Terán

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) por la M.C. Sandra Ponce Vargas

Microscopía de Fuerza Atómica. por el Dr. Ángel Licea Claveríe.

III.2 SÍNTESIS DE POLÍMEROS ENTRECruzADOS DE NIPAAm/EGDMA, VÍA POLIMERIZACIÓN EN DISPERSIÓN.

III.2.1 Purificación de NIPAAm por recristalización

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 25g de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y se disolvieron en 200 mL de hexano a 40°C; se agitó vigorosamente hasta disolver completamente a la NIPAAm, posteriormente se filtró en caliente para eliminar las impurezas insolubles. Después de filtrada la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego en un baño de agua fría para recristalizar completamente a la NIPAAm. El sólido se filtró a vacío y se lavó con hexano frío (3 x 20 mL). Finalmente el sólido (24.5g) se secó en la estufa de vacío a 25°C durante 48 h.

III.2.2 Síntesis de nanogeles de NIPAAm entrecruzados con EGDMA

Estos experimentos preliminares se llevaron a cabo con la finalidad de estudiar la formación de nanogeles por el método de polimerización en dispersión, según la ruta de síntesis en la Figura 10. Se realizaron tres diferentes soluciones acuosas al 1% compuestas por 0.5 g (4.41 mmol) de NIPAAm y con diferentes proporciones de Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) en 50 mL de agua destilada (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de EGDMA utilizadas en cada solución acuosa.

	EGDMA (% mol)	EGDMA (g, mmol)
1	EGDMA 1% mol	0.0087g (0.043 mmol)
2	EGDMA 5% mol	0.043 g (0.220 mmol)
3	EGDMA 10% mol	0.087 g (0.44 mmol)

En un matraz bola se adicionaron por separado cada una de las solución acuosas al 1%; cada sistema se desgasificó con argón por 30 minutos para eliminar el exceso de oxígeno presente. Posteriormente las soluciones se llevaron a un baño de aceite, hasta alcanzar un temperatura estable de 85°C; se adicionó el iniciador de la polimerización (APS) al 2%w/w, 0.02 g (8.7×10^{-8} mmol) con agitación constante y se continuó la polimerización por 45 minutos. Las emulsiones se purificaron por diálisis, utilizando membranas MWC de 12-14,000 Da. Las emulsiones obtenidas se observaron como un líquido blanco semitransparente y se caracterizaron vía DLS.

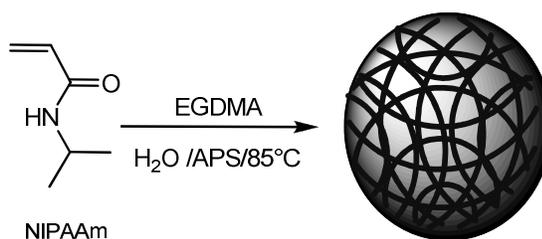


Figura 10. Ruta de síntesis para la formación de nanogeles vía polimerización en dispersión.

Tabla 2. Concentraciones de NIPAAm, PEGMAM y EGDMA utilizadas en cada una de las mezclas de reacción.

Relación (%w/w) NIPAAm:PEGMAM	NIPAAm g, mol	PEGMAM g, mol	EGDMA %	EGDMA g, mol
1			1	0.0079, 0.039
2	90:10	0.45, 3.97	5	0.039, 0.199
3		0.05, 4.5 X10 ⁻²	10	0.079, 0.390
4			1	0.0070, 0.0350
5	80:20	0.40, 3.53	5	0.034, 0.170
6			10	0.070, 0.350
7			1	0.0061, 0.030
8	70:30	0.35, 3.09	5	0.031, 0.150
9			10	0.061, 0.300
10			1	0.0052, 0.026
11	60:40	0.30, 8.83	5	0.026, 0.130
12			10	0.052, 0.265

Se realizaron diversas soluciones acuosas al 1%, disolviendo diferentes proporciones de NIPAAm, y PEGMAM (Tabla 2) en 50 mL de agua. Cada una de estas soluciones se colocó en un matraz bola, adicionando diferentes proporciones de entrecruzante (EGDMA) al 1, 5 y 10 %mol (Tabla 2).

El sistema se desgasificó con argón por 30 minutos para eliminar el exceso de oxígeno presente; posteriormente las soluciones se llevaron a baño de aceite, hasta alcanzar una temperatura estable de 85°C; se adicionó el iniciador de la polimerización (APS) al 2%w/w, 0.02 g (8.7×10^{-8} mmol) a cada una de las soluciones y con agitación constante se continuó la polimerización por 45 minutos. Las emulsiones obtenidas se purificaron por diálisis, utilizando membranas MWC de

12-14,000 Da. Las emulsiones se observaron como un líquido blanco semitransparente y se caracterizaron vía DLS.

III.3.2 Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/DVA

Con la finalidad de estudiar el efecto del entrecruzante y considerando los resultados del Dh y de estabilidad obtenidos con nanogeles entrecruzados con EGDMA, se decidió utilizar la composición de NIPAAm:PEGMAM (70:30) para los experimentos cambiando el entrecruzante a DVA. La síntesis de nanogeles entrecruzados con DVA, se llevó a cabo utilizando el método de polimerización en emulsión sin detergente, de acuerdo a la ruta de síntesis de la Figura 2. Se realizaron tres diferentes soluciones acuosas al 1% , disolviendo 0.35 g (3.09 mmol) de NIPAAm y PEGMAM 0.15 g (0.136 mmol) en 50 mL de agua y con diferentes proporciones de DVA (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de DVA utilizadas en las soluciones acuosas.

Relación (%w/w) NIPAAm:PEGMAM	DVA %	DVA g, mol
1	1	0.0065, 0.031
2 70:30	5	0.033, 0.155
3	10	0.065, 0.300

En matraces bola separados se adicionaron, las soluciones acuosas al 1%; los sistemas se desgasificaron con argón por 30 minutos para eliminar el exceso de oxígeno presente; posteriormente las soluciones se colocaron en un baño de aceite,

hasta alcanzar una temperatura estable de 85°C; se adicionó el iniciador de la polimerización APS 4% w/w, 0.04 g (8.7×10^{-8} mmol), con agitación constante, hasta continuar la polimerización por 50 minutos. Las emulsiones obtenidas se purificaron por diálisis, utilizando membranas MWC de 12-14,000 Da. Las emulsiones se observaron como un líquido blanco transparente y se caracterizaron por DLS.

III.4 SÍNTESIS DEL ÁCIDO METACRILILOLOXI-O-BENZOICO (MAOB)

La síntesis del MAOB se realizó según la ruta de síntesis (Figura 12) reportada por Licea y colaboradores.⁷⁴ En un baño de hielo, se colocó un matraz bola de tres bocas (250 ml), equipado con un termómetro y una barra magnética, se disolvieron bajo agitación, 6.91g (50 mmol) de ácido salicílico y 0.49g (4 mmol) de DMAP en 8.42mL de trietilamina y 20 mL de diclorometano. Esta solución se llevó a 0°C en baño de hielo; posteriormente, con una jeringa de adición se agregó gota a gota 7.50g (50 mmol) de anhídrido metacrílico previamente purificado. La solución se agitó por 5 horas a 0°C, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución obtenida se concentró al vacío y se lavó 4 veces con 25 mL de HCl 2N y la fase orgánica se secó con MgSO₄. El producto se purificó por recristalización con éter de petróleo, el monómero obtenido se lavó con agua caliente, después con agua fría y por último con éter de petróleo; posteriormente se refrigeró hasta su uso. El producto se observó como un sólido blanco esponjoso y se caracterizó por FTIR y ¹H RMN (Anexo 1).

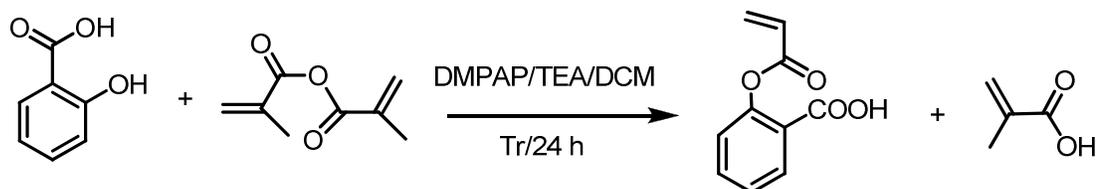


Figura 12. Ruta de síntesis para la obtención del MAOB.

III.5 SÍNTESIS DE NANOGELES NÚCLEO-CORAZA DE NIPAAm/MAOB VÍA POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN SIN DETERGENTE

Considerando los resultados obtenidos en el Dh y la estabilidad, con diferentes proporciones de PEGMAM y diferentes entrecruzantes, se decidió utilizar la composición de NIPAAm:PEGMAM (70:30) para realizar los experimentos con núcleo aniónico.

Con la finalidad de estudiar la incorporación del grupo aniónico y el efecto en la temperatura de transición con el pH, se ensayó la incorporación del grupo ácido anfifílico (MAOB) utilizando diferentes proporciones molares con respecto a la NIPAAm, 5,10 y15% respectivamente. Este grupo aniónico permitirá la interacción con fármacos mediante puentes de hidrógeno o interacciones iónicas para optimizar el cargado de fármacos. La síntesis de nanogeles con núcleo ácido, se llevó a cabo utilizando el método de polimerización en emulsión sin detergente, de acuerdo a la ruta de síntesis de la Figura 13.

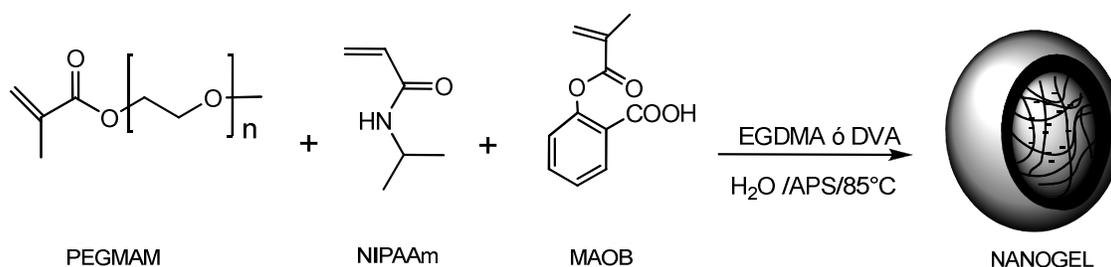


Figura 13. Ruta de síntesis para la formación de nanogeles con núcleo ácido.

III.5.1 Síntesis de nanogeles de NIPAAm/EGDMA/MAOB

Considerando los resultados obtenidos en el Dh y la estabilidad con diferentes proporciones del entrecruzante EGDMA, para continuar con los experimentos de la incorporación al núcleo del grupo aniónico se decidió utilizar la composición de NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{5%mol}.

La síntesis de nanogeles con núcleo ácido entrecruzados con EGDMA, se llevó a cabo por el método de polimerización en emulsión sin detergente, de acuerdo a la ruta de síntesis de la Figura 13. Se realizaron tres diferentes soluciones acuosas al 1% w/w de monómeros compuestas por, 0.35 g (3.09 mmol) de NIPAAm, 0.15g (0.136 mmol) de PEGMAM, y 0.031g, (0.150 mmol) de EGDMA en 50 mL de agua destilada y con diferentes proporciones de MAOB (Tabla 4):

Tabla 4. Concentraciones de MAOB utilizadas en las reacciones estudiadas.

Relación (%w/w) NIPAAm:PEGMAM	MAOB %	MAOB g, mol
1	5	0.032, 0.155
2 70:30	10	0.064, 0.310
3	15	0.095, 0.460

En cada una de estas soluciones se trabajó de acuerdo al método de síntesis descrito anteriormente (sección III.3.1). Las emulsiones obtenidas se observaron como un líquido blanco turbio y se caracterizaron utilizando técnicas adecuadas para sistemas coloidales.

III.5.2 Síntesis de nanogeles de NIPAAm/DVA/MAOB

Considerando los resultados obtenidos en el D_h y la estabilidad, con diferentes proporciones del entrecruzante DVA, para continuar con los experimentos de la incorporación del grupo aniónico se decidió utilizar la composición de NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{5%mol}.

La síntesis de nanogeles con núcleo ácido entrecruzados con DVA, se llevó a cabo utilizando el método de polimerización en emulsión sin detergente, de acuerdo a la ruta de síntesis de la Figura 13.

Se realizaron tres diferentes soluciones acuosas al 1% w/w de monómeros compuestas por 0.35 g (3.09 mmol) de NIPAAm, 0.15 g (0.136 mmol), 0.033g (0.155 mmol) de DVA en 50 mL de agua destilada y con diferentes proporciones MAOB de acuerdo a la Tabla 4.

Para realizar la síntesis se utilizó el método descrito anteriormente en la sección III.3.2, utilizando APS 4% w/w, 0.04 g (8.7×10^{-8} mmol). Las emulsiones obtenidas se observaron como un líquido blanco semitransparente y se caracterizaron utilizando diferentes técnicas para sistemas coloidales.

III.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA LOS NANOGELES SINTETIZADOS DE NIPAAm/MOAB

a) Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Se utilizó el equipo de Dispersión de Luz Dinámica con la finalidad de caracterizar la formación y el tamaño de los nanogeles en las emulsiones obtenidas. Se diluyeron 100 μ L de muestra aforando a un volumen de 10 mL de agua destilada y filtrada, luego se procedió a correr la muestra en el equipo haciendo un barrido de temperaturas, de 20°C a 50°C, obteniendo el % en volumen de tamaños y la curva de transición de los nanogeles.

b) Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Se utilizó un calorímetro TA Instruments, MDSC 2920 modulado, con la finalidad de caracterizar la composición de los nanogeles. Para la determinación de la Tg se utilizó el siguiente método de análisis: Equilibra a -40°C, Isotérmico por 10 minutos, Modular +/- 0.50°C cada 60 segundos y rampa 5.00°C/min hasta 200°C. Para la determinación de la LCST se utilizó el siguiente método de análisis: Equilibrar a 5°C, Isotérmico por 10 minutos, Modular +/- 0.50°C cada 60 segundos y rampa 10°C/min hasta 200°C.

c) Potencial Z. Se utilizó el equipo DTS nano para analizar el potencial z con la finalidad de determinar la carga de la superficie de los nanogeles. Se tomaron 100 μ L de las emulsiones previamente purificadas y se diluyeron en 10 mL de solución amortiguadora a diferentes pH (de 3 a 10); cada una de las diluciones se colocaron en cubetillas para posteriormente analizar el potencial Z.

d) Determinación del contenido de MAOB por titulación ácido-base. Con la finalidad de cuantificar el ácido incorporado en el núcleo de los nanogeles, se utilizó

el método de retrotitulación ácido-base. En un vaso de precipitados se adicionaron 2 mL de NaOH 0.1N con 10 mL de agua y se adicionaron 100 mg de nanopartículas con agitación constante; posteriormente se adicionaron gota a gota 3 mL de HCl 0.001N, se tomaron lecturas de pH (cada 0.05 ml) y obteniéndose la curva de titulación y la curva de la derivada del pH.

e) Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). Con el equipo de AFM se analizó la morfología de los nanogeles de acuerdo al siguiente método: Se colocó una gota de la emulsión [1%(w/w)] en la superficie de un portaobjetos (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA), se dejó secar por 60 minutos y posteriormente la muestra se observó en el microscopio.

f) Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM). En el equipo de microscopía TEM se analizó la presencia de núcleo-coraza en los nanogeles, utilizando un marcador radioactivo como agente de contraste. Se adicionó una gota de la suspensión de nanopartículas al 1%w/w a una superficie de malla 30 de cobre recubierta con carbono. A esta gota se le agregaron dos gotas de solución acuosa de acetato de uranilo al 2%. Las muestras se secaron en una estufa de vacío a 25°C y 40°C por 24 h. Las muestras secas se sujetaron en el TEM y se observaron a 8kV.

III.7 LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES

Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado a todos los nanogeles sintetizados de composición NIPAAm/PEGMAM/MAOB, con la finalidad de aplicarlos al la parte experimental de cargado y liberación de fármacos,

analizando las modificaciones y/o la estabilidad en su morfología, su estructura y su radio hidrodinámico.

a) Liofilización

Se tomaron los 50 mL de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas, se congelaron en viales de LabConco; posteriormente se colocaron en el liofilizador por cuatro días para obtener las muestras completamente secas. Se obtuvieron las emulsiones liofilizadas y se observaron como un polvo blanco esponjoso.

b) Reconstitución

Para reconstituir el material liofilizado, en un vial se mezclaron 100 mg del polvo liofilizado con 10 mL de agua destilada y filtrada bajo agitación constante durante 5 horas. Una vez reconstituida la emulsión, se diluyó una alícuota de 100 μ l en 10 mL de agua. Se realizó la caracterización de las muestras reconstituidas vía DLS de acuerdo al método anteriormente descrito en la sección III.6 inciso a, haciendo un barrido de temperaturas en el intervalo de 20 a 50°C, para observar los cambios en los nanogeles con respecto al proceso de liofilización y reconstitución.

III.8 SÍNTESIS A GRAN ESCALA DE NANOGELAS NIPAAm/MAOB VÍA POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN SIN DETERGENTE

Se realizó la síntesis a gran escala (1 Litro) de nanogeles con núcleo ácido, de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} y

NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} utilizando el método de polimerización en emulsión sin detergente, de acuerdo a la ruta de síntesis de la Figura 13. Se realizaron 2 soluciones acuosas al 1%, compuesta por 7g (61.85 mmol) de NIPAAm, 3 g (2.72 mmol) de PEGMAM y 1.27g (6.85 mmol) de MAOB en 1000 mL de agua destilada y filtrada. Cada una de estas soluciones se colocaron en el reactor bajo atmósfera de nitrógeno, adicionando los diferentes entrecruzantes y las diferentes proporciones de iniciador (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de entrecruzantes e iniciador utilizados en cada una de la reacciones a gran escala.

Entrecruzante 5% mol	Entrecruzante (g, mmol)	APS %w/w	APS g, mmol
DVA	0.66, 3.1	4	0.8, 174.0
EGDMA	0.62, 3.0	2	0.4, 87.0

El reactor se conectó a un sistema de reflujo para alcanzar la estabilidad de la temperatura a 85°C; una vez con la temperatura en equilibrio, se adicionó el iniciador de la polimerización (APS) y con agitación constante a 500 rpm se continuó la polimerización por 50 minutos. Las emulsiones se purificaron durante una semana por diálisis, utilizando membranas MWC de 12-14,000 Da. Las emulsiones obtenidas se observaron como un líquido blanco y se caracterizaron vía DLS.

III.9 CARGADO DE LOS NANOGELES

Para llevar a cabo el cargado de los nanogeles, se realizaron ensayos preliminares para obtener las condiciones adecuadas para la incorporación del fármaco hacia el núcleo de los nanogeles. Los ensayos se realizaron con nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} y NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} variando las condiciones como la temperatura de cargado, la temperatura de recuperación, y el medio de cargado.

III.9.1 Cargado de los nanogeles con 5-Fluorouracilo

El cargado de nanogeles se llevó a cabo de acuerdo a la Figura 14 por el método de equilibrio. Se cargaron 30 mg de 5-FU en 100 mg de nanogeles: Se redispersaron 100 mg de nanogeles en una solución que contiene 30 mg de 5-FU. Esta solución se llevó al recirculador a 20°C por 24 h. Para recuperar los nanogeles cargados, se centrifugó la solución cargada, a 9500 rpm a 20°C por 60 minutos, el precipitado se separó del sobrenadante y se liofilizó para continuar con el análisis de cargado.



Figura 14. Diagrama de flujo para el cargado de los nanogeles con 5-Fluorouracilo.

Para cuantificar el fármaco cargado por HPLC, se realizó el siguiente procedimiento: Se pesó 1 mg de nanogeles cargados y se resuspendieron en solución amortiguadora de fosfatos 7.4 con agitación constante en un recirculador a 10 °C por 24 horas, posteriormente se filtró la solución y se analizó por HPLC para obtener la eficiencia de cargado y el porcentaje de carga de cada uno de los grupos de nanogeles. Los cálculos para obtener el porcentaje de carga y la eficiencia se pueden analizar en el anexo 5.

III.9.2 Cargado de los nanogeles con Doxorrubicina

El cargado de nanogeles con DOX, se llevó a cabo de acuerdo al diagrama de la Figura 15. Se cargaron 4.5mg de DOX en 30 mg de nanogeles: se redispersaron 30 mg de nanogeles en 8 mL de agua, una vez reconstituidos los nanogeles, se adicionó un volumen de NaOH 0.1 M para dar una cantidad equimolar de NaOH con los grupos ácidos del nanogel (0.45 mL), posteriormente se agregó una solución de DOX compuesta por 4.5 mg del fármaco en 1.25 mL de agua. Esta mezcla se llevó al recirculador a 20°C por 5 horas con agitación constante. Para recuperar los nanogeles cargados, se centrifugó la solución cargada a 9500 rpm a 20°C por 60 minutos. El precipitado se separó del sobrenadante y se liofilizó para continuar con el análisis de cargado.

Para cuantificar el fármaco cargado, se realizó el siguiente procedimiento: Se pesó 1 mg de nanogeles cargados y se resuspendieron en una mezcla de DMA:H₂O (1:1) pH3, a 4 °C con agitación constante en un recirculador por 5 horas.

Posteriormente la solución con el fármaco liberado se analizó mediante espectrofotometría UV-VIS para obtener la eficiencia de cargado y el porcentaje de carga de cada uno de los grupos de nanogeles cargados. Los cálculos para obtener el porcentaje de carga y la eficiencia se pueden analizar en el anexo 5.

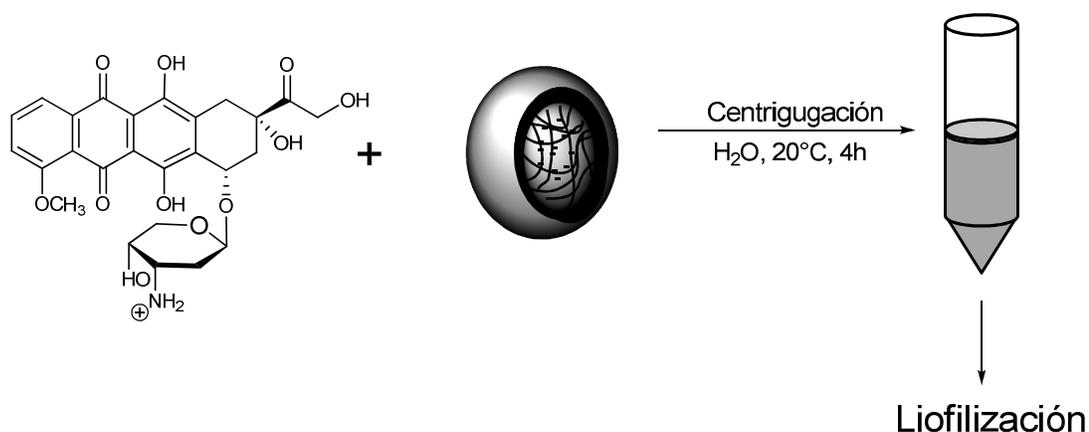


Figura 15. Diagrama de flujo para el cargado de los nanogeles con DOX.

III.9.3 Curva de calibración del 5-Fluorouracilo por HPLC

Para la cuantificación del fármaco en el cargado de los nanogeles, se utilizó el equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Se realizó la validación del método analítico para el 5-FU, se evaluaron los parámetros analíticos según lo reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), linealidad, precisión, exactitud y especificidad y límite de detección. En el método validado las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Se utilizó una fase móvil compuesta por metanol:amortiguador a pH 5 (10:90), una velocidad de flujo de 1mL/min, una presión

de 750 kPa, en el detector una longitud de onda de 267 nm, el tiempo de elución de 8 minutos por muestra, el tiempo de retención entre 6.5 y 7 minutos y volumen de inyectado de 25 μ l. Esta validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas de que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado esperado. Posteriormente se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones del fármaco, utilizando los datos de las áreas bajo la curva obtenidas con cada concentración (Anexo 6).

III.9.4 Curva de calibración de la DOX por UV-VIS

Se realizó una curva de calibración (Anexo 7) para el análisis del cargado con DOX, utilizando una solución madre compuesta de DMA:H₂O 1:1 pH 3, con una concentración de 1mg/mL y las muestras a diferentes diluciones para obtener concentraciones en la escala de μ g/mL, disueltas en DMA:H₂O 1:1 pH 3. Los análisis de control de proceso del fármaco, se realizaron empleando el espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Coulter DU520) con las siguientes condiciones: cubetas de cuarzo con paso óptico de 1cm, con una longitud de onda de 485 nm y las soluciones blancos de DMA:H₂O 1:1 pH 3.

III.10 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.

Estos ensayos tienen la finalidad de analizar la cinética de liberación de los fármacos modelos cargados en los nanogeles, con respecto al pH y la temperatura. Para obtener la cinética de liberación, estos ensayos se realizaron en condiciones

fisiológicas normales y en condiciones fisiológicas de una célula neoplásica (Tabla 6):

Tabla 6. Condiciones fisiológicas de las células en diferentes estados.

Condición de la célula	pH	Temperatura (°C)
Normal	7.4	37
Neoplásica	5	42

III.10.1 Degradación del DVA

Además, con la finalidad de analizar la liberación de los fármacos por medio de la degradación del entrecruzante lábil al pH, se realizaron experimentos para nanogeles entrecruzados con DVA expuestos a pH ácido.

Se tomó 1 mL de la emulsión de nanogeles y se aforó a 10 mL con una solución amortiguadora de fosfatos pH 5.5 y se expusieron a 42°C por 48 horas; posteriormente se analizó el cambio de los nanogeles en su Dh vía DLS, mediante las gráficas de % en volumen con respecto al Dh y al tiempo.

III.10.2 Estudios de liberación de nanogeles cargados con 5-FU.

Se prepararon tres membranas de diálisis WCO de 15,000 Da. En una membrana se colocó una solución de amortiguadora 7.4, que contiene 3 mg de 5-FU como solución de referencia, en las otras dos membranas se colocaron 10 mL de solución amortiguadora 7.4 y una cantidad de nanogeles cargados con 3 mg de

5-FU. Posteriormente las tres membranas se llevaron a viales con 100 ml de solución amortiguadora, los viales que contienen a las membranas, se mantuvieron a una temperatura controlada de 37°C, se tomaron muestras del medio en intervalos de 1 hora durante 24 horas. Cada muestra recolectada fue analizada mediante espectrofotometría UV-VIS usando como blanco a la solución amortiguadora de fosfatos 7.4. Este experimento de liberación controlada, se repitió modificando el medio de liberación a solución amortiguadora de fosfatos pH 5 y la temperatura controlada se modificó a 42°C. Los cálculos utilizados para la cuantificación del fármaco liberado se muestran en el Anexo 8.

III.10.3 Estudios de liberación de nanogeles cargados con DOX

Se prepararon tres membranas de diálisis WCO de 15,000 Da. En una membrana se colocó una solución amortiguadora 7.4, que contiene 1 mg de DOX como solución de referencia, en las otras dos membranas se colocaron 10 mL de solución amortiguadora pH 7.4 y una cantidad de nanogeles cargados con 1mg de DOX. Posteriormente las tres membranas se transfirieron a viales con 50 mL de una solución amortiguadora, las cuales se mantuvieron a una temperatura controlada de 37°C, se recolectaron muestras del medio a intervalos de 1 hora durante 72 horas. Cada muestra recolectada se analizó mediante espectrofotometría UV-VIS tomando como blanco el amortiguador de fosfatos 7.4. Este experimento de liberación controlada, se repitió modificando el medio de liberación a una solución amortiguadora de fosfatos pH 5 y modificando la temperatura controlada a 42°C. Los

cálculos utilizados para la cuantificación del fármaco liberado se muestran en el Anexo 9.

III.10.4 Curva de calibración del 5-FU por UV-VIS

Para el análisis de la liberación del 5-fluorouracilo, se realizó una curva de calibración (Anexo 10), utilizando una solución de trabajo a una concentración de 1mg/mL y se preparó una serie de diluciones en un intervalo de concentraciones en la escala de $\mu\text{g/mL}$, disueltas en solución amortiguadora de fosfatos 7.4 previamente filtrada. Los análisis de control de proceso del fármaco, se realizaron empleando el espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Coulter DU520) con las siguientes condiciones: cubetas de cuarzo con paso óptico de 1cm, con una longitud de onda de 267 nm y como solución blanco la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

III.10.5 Curva de calibración de la DOX por UV-VIS

Para el análisis de las liberaciones de la doxorrubicina, se realizó una curva de calibración (Anexo 11), utilizando una solución de trabajo a una concentración de 1mg/mL y se preparó una serie de diluciones para obtener concentraciones en la escala de $\mu\text{g/mL}$ disueltas en agua destilada y filtrada. Los análisis de control de proceso del fármaco se realizaron empleando el espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Coulter DU520) con las siguientes condiciones: cubetas de cuarzo con paso óptico de 1cm, a una longitud de onda de 485 nm y usando como blanco agua destilada y filtrada.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 SÍNTESIS DE POLÍMEROS ENTRECruzADOS DE NIPAAm/EGDMA, VÍA POLIMERIZACIÓN EN DISPERSIÓN.

IV.1.1 Síntesis de nanogeles de NIPAAm entrecruzados con EGDMA

En el ensayo preliminar para el estudio de la formación de nanogeles, se obtuvieron diferentes dispersiones; el producto se observó como un líquido blanco semitransparente, aumentando la intensidad del color con respecto a la concentración del entrecruzante. Estas dispersiones se caracterizaron vía DLS, para analizar el tamaño de partícula con el Dh; estos resultados se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Dh de los nanogeles sintetizados con NIPAAm/EGDMA a 26°C.

Código de muestra	NIPAAm:PEGMAM (%W/W)	APS (%mol)	EGDMA (% mol)	Dh (nm) 26°C
R17/PN89			1%	750 ± 125
PN90	100	2%	5%	878 ± 100
PN6-1			10%	1772 ± 259

En el análisis de las dispersiones, se obtuvieron gráficas con una sola distribución de tamaños con el porcentaje en volumen. Los nanogeles entrecruzados con EGDMA_{1%mol} son de menor Dh, en comparación con los hidrogeles entrecruzados con EDGMA_{5%mol}, y EGDMA_{10%mol} respectivamente (Figura 16). Si se observan las distribuciones, a menor proporción de entrecruzante, menor es el diámetro de los hidrogeles. En el efecto de la temperatura contra la intensidad de dispersión, se observa un cambio abrupto en el tamaño de los hidrogeles a los 32°C, este cambio corresponde a la LCST de la NIPAAm, en la cual los hidrogeles pasan

de un estado hidrofílico a un estado hidrofóbico o bien, de hinchado a colapsado. Esto indica que a 32°C los nanogeles se colapsan aumentando la intensidad de dispersión de la luz en el medio (Figura 17).

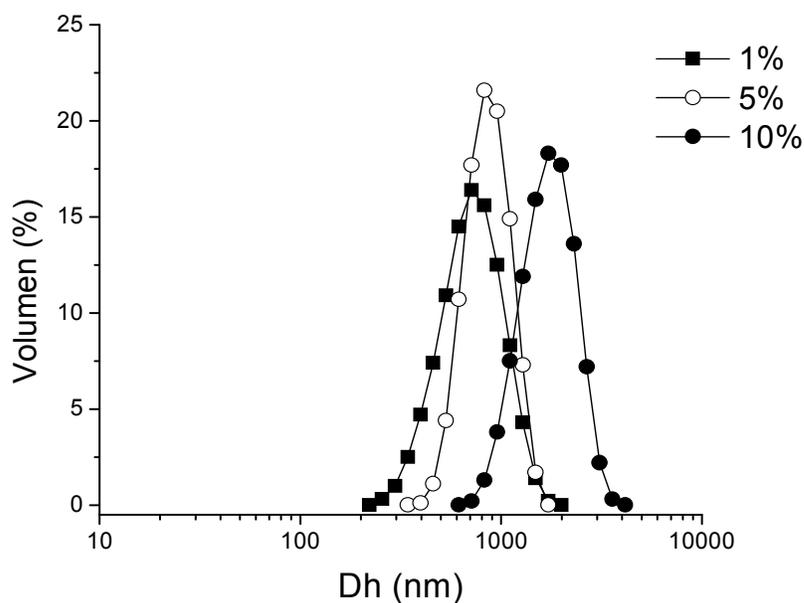


Figura 16. Distribución de tamaños por volumen de los microgeles entrecruzados con diferentes proporciones molares de EGDMA.

Con el método de polimerización en dispersión se obtienen hidrogeles a escala micrométrica, y con los resultados anteriormente descritos, se propuso realizar experimentos para obtener emulsiones estabilizadas por un macrómero, con el metacrilato de polietilenglicol metiléter (PEGMAM) esperando que la estabilidad produzca partículas a escala nanométrica.

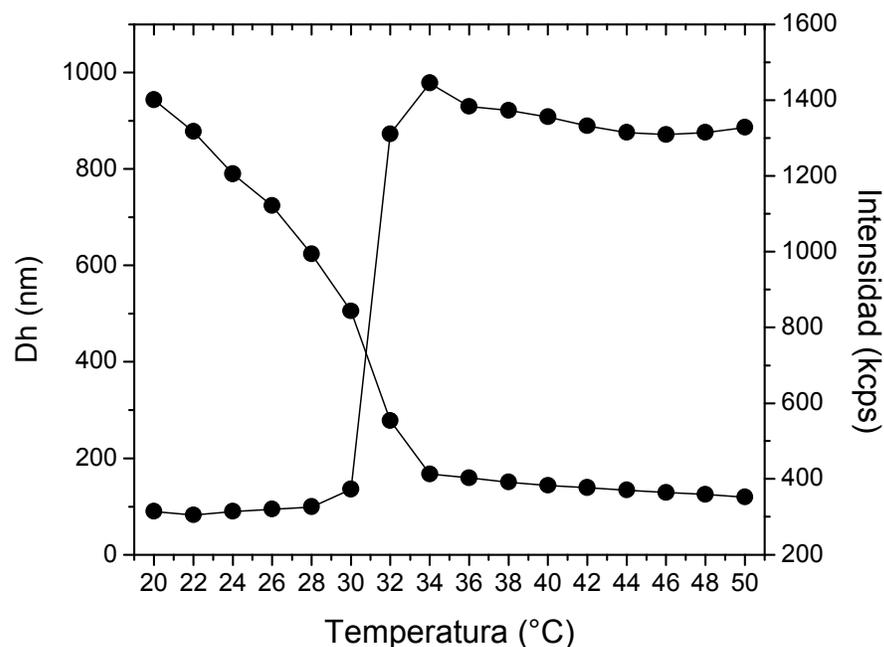


Figura 17. Efecto de la temperatura en el Dh y la derivada del conteo de la dispersión de luz para hidrogeles entrecruzados con EGDMA_{1%mol}.

IV.2 SÍNTESIS DE NANOGELES NÚCLEO-CORAZA VÍA POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN SIN DETERGENTE

Estos experimentos se llevaron a cabo con la finalidad de analizar la formación de nanogeles con coraza de polietilenglicol, variando las relaciones de NIPAAm:PEGMAM; así como los entrecruzantes y sus proporciones molares al 1,5 y 10%. Los productos obtenidos en estos experimentos se caracterizaron vía DLS para determinar el tamaño (Dh) y número de distribuciones del % de tamaños en volumen.

IV.2.1 Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/EGDMA

Se obtuvieron doce emulsiones con aspecto diferente c/u, de acuerdo con la proporción de estabilizante y de entrecruzante; la intensidad del color blanco semitransparente al aumentar el peso de estabilizante; emulsiones con bajas concentraciones de estabilizante presentaron un aspecto blanquizco. Las emulsiones obtenidas en los experimentos se caracterizaron vía DLS, obteniendo los tamaños de partícula con respecto a la temperatura y analizando el número de distribuciones y el tamaño de partícula; estos resultados se pueden analizar en la Tabla 8.

Tabla 8. Dh de los nanogeles sintetizados con NIPAAm/PEGMAM/EGDMA a 26°C.

Código de muestra	NIPAAm:PEGMAM (%W/W)	EGDMA (% mol)	Dh (nm) 26°C
PN51		1%	634 ± 110
PN23	90:10	5%	873 ± 110
PN37		10%	1043±150
PN62		1%	430±80
PN63	80:20	5%	528±70
PN60		10%	540±70
PN67		1%	127 ± 18
PN69	70:30	5%	295 ± 50
PN70		10%	Pp
PNE1		1%	239 ± 43, 60 ± 11
PNE2	60:40	5%	Pp
PNE3		10%	Pp

En los resultados que se muestran en la Tabla 8, se puede observar que con proporciones de NIPAAm:PEGMAM (70:30) se lograron obtener Dh menores en comparación con las demás proporciones de NIPAAm:PEGMAM (90:10) y NIPAAm:PEGMAM (80:20), manteniendo su LCST cercana a los 38°C, (Figura 18). En los experimentos de composición NIPAAm:PEGMAM (60:40) se observa un precipitado al final de reacción, esto significa que a mayor concentración del estabilizante podría haber una polimerización del PEGMAM que está en exceso formando un precipitado. (Figura 19).

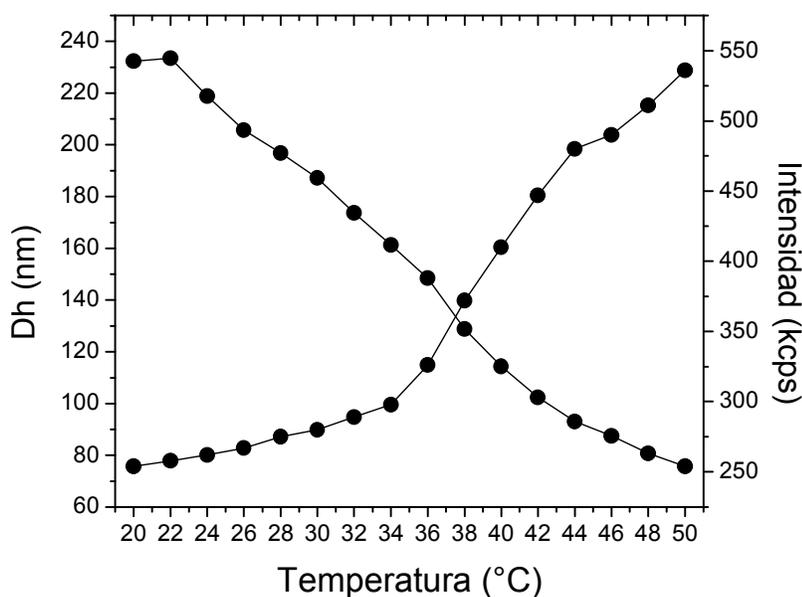


Figura 18. Barrido de temperaturas de los nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA 5%mol.

El efecto de la concentración del entrecruzante dentro de los experimentos con proporciones NIPAAm:PEGMAM (70:30), se observa que a menor proporción de entrecruzante es menor el Dh.

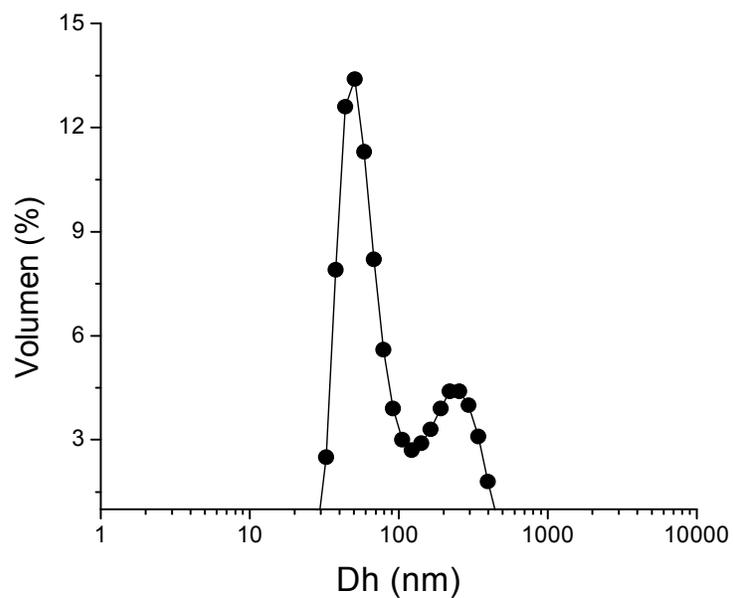


Figura 19. Distribuciones de tamaños por volumen de nanogeles de NIPAAm:PEGMAM (60:40)/EGDMA_{1%mol}.

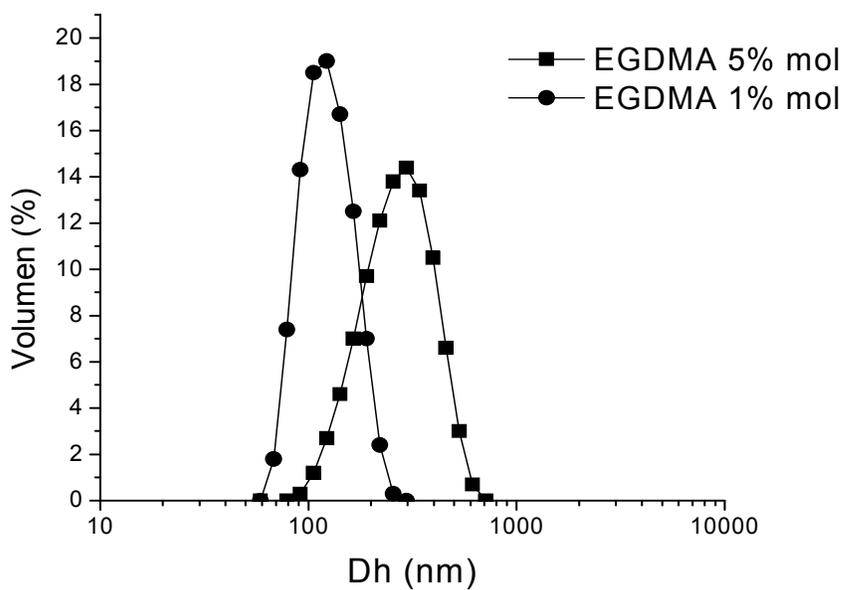


Figura 20. Efecto de la concentración del entrecruzante (EGDMA) en nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30) .

Por lo tanto los nanogeles entrecruzados con EGDMA_{1%mol} se obtuvieron con un Dh menor de aproximadamente 150 nm. De acuerdo con esto datos, los nanogeles entrecruzados con EGDMA_{1%mol}, los nanogeles entrecruzados con EGDMA_{1%mol} y EGDMA_{5%mol} (Figura 20) se analizarán para determinar su respectiva estabilidad al proceso de liofilizado y reconstitución para aplicaciones posteriores a la incorporación del grupo aniónico y para el cargado de fármacos.

IV.2.2 Reconstitución y liofilización de los nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/EGDMA

Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado, para aquellos nanogeles que presentaron los mejores resultados en cuanto a la formación y al tamaño. Por ello se analizó la estabilidad al proceso de liofilizado y de reconstitución a los nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{1%mol} y NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{5%mol}.

Con la liofilización se logró obtener el rendimiento de la síntesis de nanogeles, que para los nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{1%mol} fue del 76% y el rendimiento para NIPAAm:PEGMAM (70:30)/EGDMA_{5%mol} fue del 85%. Los productos liofilizados se observan como un polvo blanco esponjoso y el polvo reconstituido se observa como un líquido blanquizco, el cual se caracterizó vía DLS para analizar la estabilidad del tamaño y el número de distribuciones al proceso de liofilizado, obteniendo los resultados que se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Dh de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM(70:30)/EGDMA reconstituidos a 26°C .

Código de muestra	EGDMA (% mol)	Dh (nm) 26°C	Dh (nm)26°C reconstitución
PN84	1%	127 ± 18	29±5, 243±68, 4736±489
PN80	5%	295 ± 50	380±75

En estos resultados se puede observar que los nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA_{1%mol} no son estables al proceso de liofilizado, ya que no se logró obtener la forma y el tamaño original de los nanogeles. Esto se puede observar en la Figura 21 en donde se muestran distribuciones de tamaños multimodales, las cuales nos indican que los nanogeles se rompen con el proceso de recuperación. En cuanto a los nanogeles NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA_{5%mol} estos son más estables a los procesos de liofilizado y reconstitución, manteniendo su tamaño con distribuciones monomodales (Figuras 22 y 23) manteniendo su LSCT ≈ 37°C observada en la gráfica de intensidad de dispersión de la luz (Figura 24).

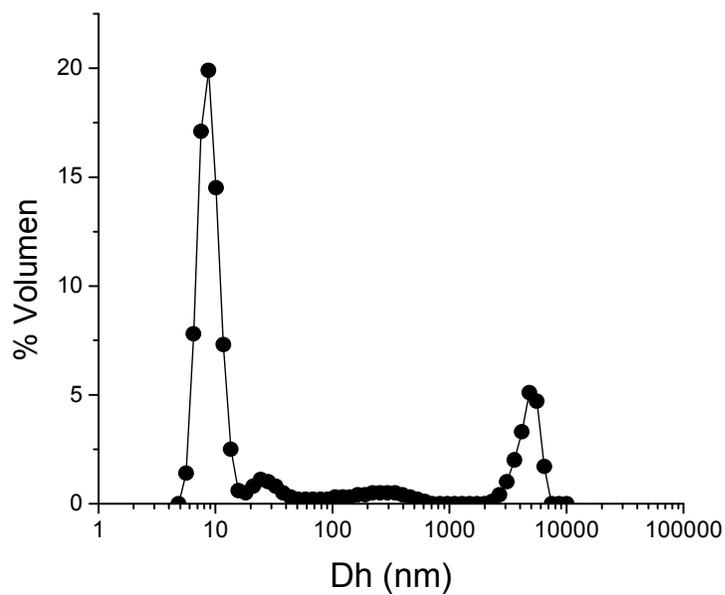


Figura 21. Distribución de tamaños por volumen de nanogelios liofilizados y reconstituidos de NIPAAm:PEGMA(70:30)/EGDMA_{1%mol}.

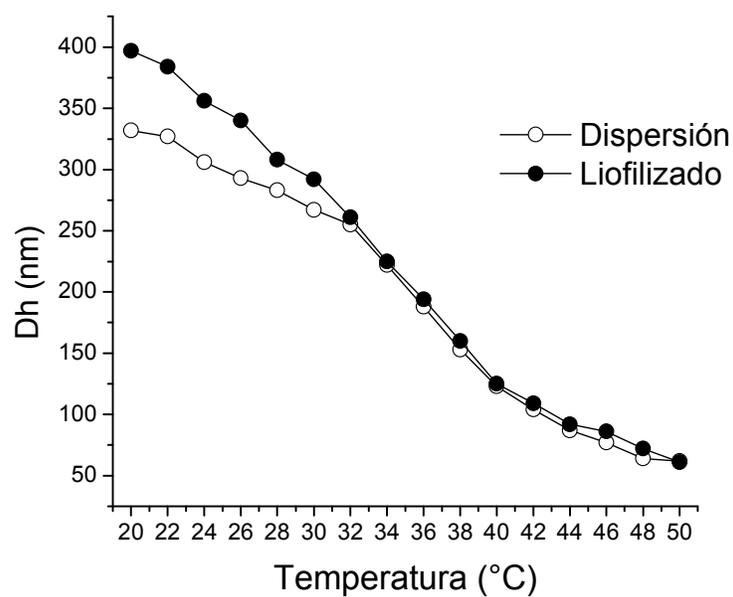


Figura 22. Efecto de la temperatura en el Dh de nanogelios entrecruzados con EGDMA_{5%mol} liofilizados y reconstituidos.

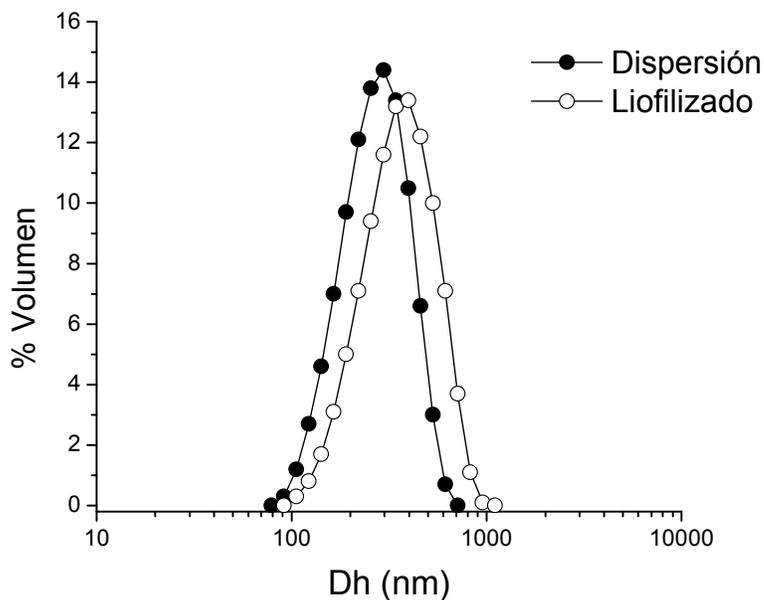


Figura 23. Distribución de tamaños por volumen de nanogel entrecruzados con EGDMA5% liofilizados y reconstituidos.

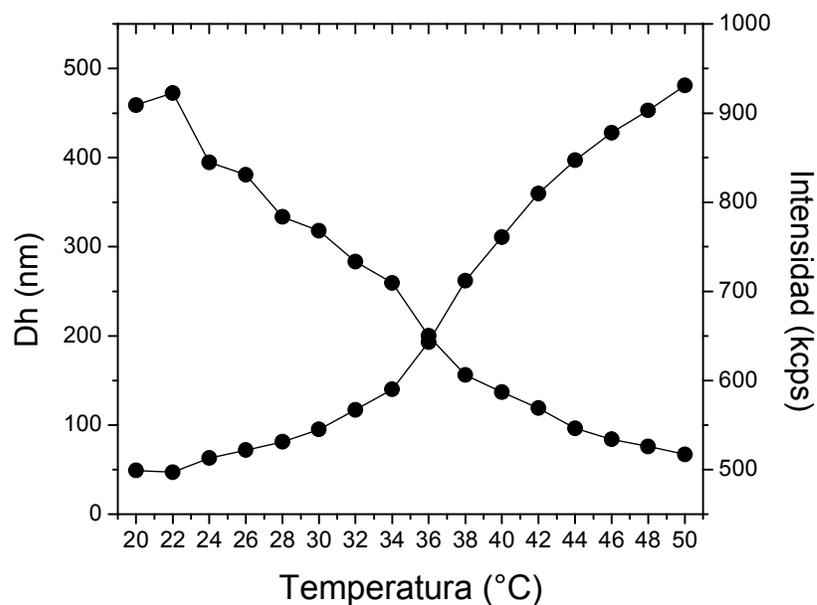


Figura 24. LCST de los nanogel reconstituidos de composición NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA_{5%mol}.

Con los experimentos y los datos obtenidos anteriormente podemos concluir que la composición de nanogeles NIPAAm:PEGMAM(70:30)/EGDMA_{5% mol} es la más adecuada para continuar las síntesis de nanogeles en donde se incorporarán grupos aniónicos al núcleo de los mismos, mediante reacciones de polimerización en emulsión sin detergente copolimerizando con MAOB.

IV.2.3 Síntesis de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/DVA

Se realizaron experimentos de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30) utilizando como entrecruzante al DVA, variando las proporciones a 1,5 y 10% mol. Se obtuvieron tres emulsiones con aspecto diferente c/u, de acuerdo con la proporción de entrecruzante; la opacidad aumentó al aumentar la concentración de entrecruzante (DVA). Las emulsiones obtenidas en los experimentos, se caracterizaron vía DLS, analizando el número de distribuciones de tamaños y el tamaño de la partícula con el Dh; estos resultados se pueden analizar en la Tabla 10.

Tabla 10. Dh de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM(70:30)/DVA a 26°C .

Código de muestra	DVA (% mol)	Dh (nm) 26°C
S/N	1%	75 ± 10
Ac9	5%	80±9
Ac17	10%	88±12, 563±27

En el grupo de nanogeles entrecruzados con $DVA_{10\%mol}$ se presentaron dos distribuciones. Una distribución aparece en la escala de micrómetros, indicando la presencia de algún precipitado, por lo tanto con esta concentración no se logró obtener la formación completa de los nanogeles; los nanogeles entrecruzados con $DVA_{1\%mol}$ y $DVA_{5\%mol}$ tuvieron tamaños de ≈ 75 nm y 80 nm a $26^\circ C$ respectivamente, con una sola distribución de tamaños (Figura 25), presentando una transición continua con la temperatura (Figura 26). Por lo tanto, a menor proporción de entrecruzante es menor el Dh; y de acuerdo al tamaño (Dh), los nanogeles entrecruzados con $DVA_{1\%mol}$ y $DVA_{5\%mol}$ se analizarán para su respectiva estabilidad al proceso de liofilizado y reconstitución para las aplicaciones posteriores a la incorporación del grupo aniónico al núcleo y para el cargado de fármacos.

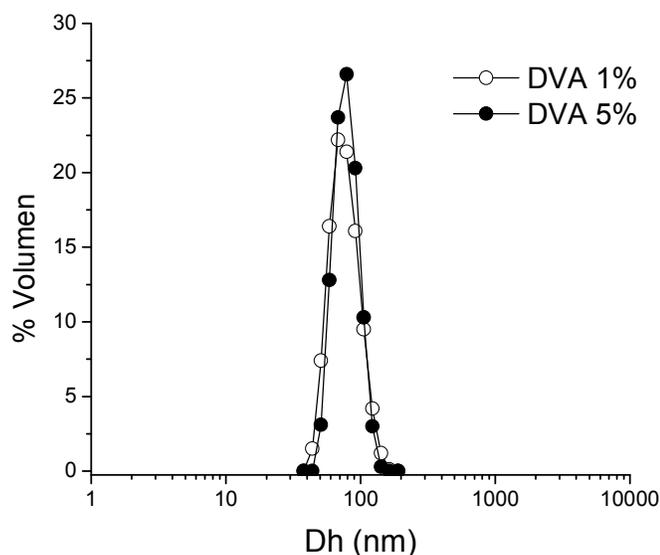


Figura 25. Distribución de tamaños por volumen de nanogeles con entrecruzados con DVA.

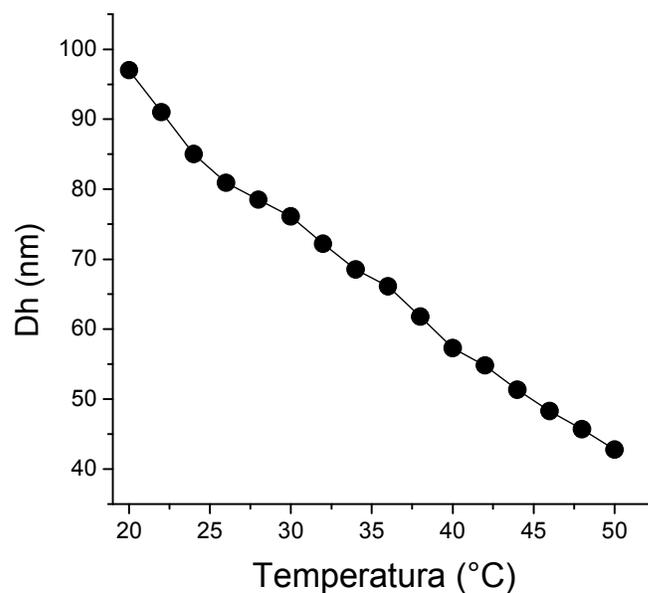


Figura 26. Barrido de temperaturas para nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}

IV.2.4 Reconstitución y liofilización de los nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/DVA

Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado y reconstitución con nanogeles que presentaron los mejores resultados en cuanto a la formación y el menor Dh. Por ello se eligió a los nanogeles de composición, NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{1%mol} y NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{5%mol} para tales análisis. Con la liofilización se logró cuantificar el rendimiento de los nanogeles, obteniéndose el 76% de rendimiento para los nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{1%mol} y el 83% para nanogeles de composición NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{5%mol}. Los productos liofilizados se observan como un polvo blanco esponjoso y el polvo reconstituido se observa como un líquido

blnaquizco traslúcido, el cual se caracterizó vía DLS con el fin de establecer la estabilidad al proceso de liofilizado. Los resultados de estos análisis se observan en la tabla 11.

Tabla 11. Dh de los nanogeles de composición, NIPAAm/PEGMAM(70:30)/DVA, reconstituidos a 26°C .

Código de muestra	DVA (% mol)	Dh (nm) 26°C	Dh (nm)26°C reconstitución
Ac52	1%	75 ± 10	36±8, 10±1, 2531±500
Ac18-5	5%	80 ± 9	82±10

Se puede observar que los nanogeles NIPAAm:PEGMAM(70:30)/DVA_{1% mol} no conservan su estabilidad después del proceso de liofilizado ya que no se logró obtener la forma y el tamaño original de los nanogeles. Esto se puede observar en la Figura 27 en donde se muestran las distribuciones de tamaños multimodales, las cuales nos indican que los nanogeles se rompen con los procesos de liofilización y/o reconstitución. Con respecto a los nanogeles NIPAAm:PEGMAM(70:30)/DVA_{5%mol} las distribuciones son monomodales (Figura 28) lo cual nos indica que estos nanogeles mantienen su estabilidad a los proceso de liofilización y reconstitución, manteniendo su tamaño (Figura 29).

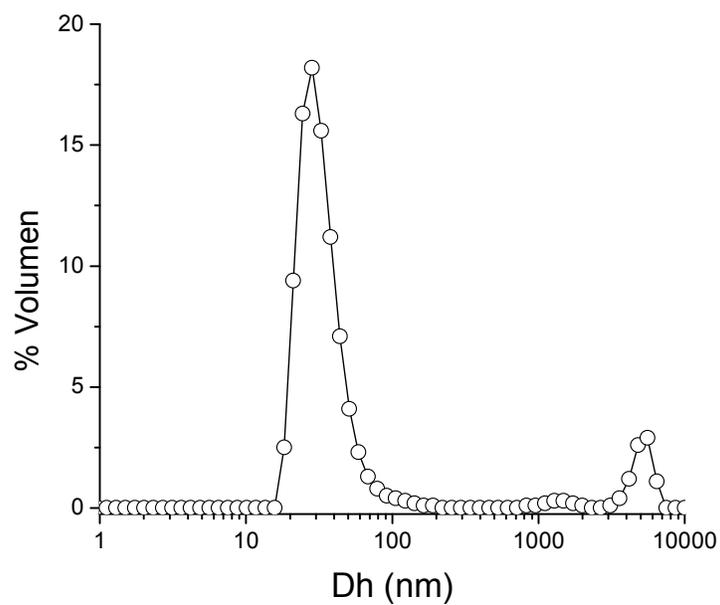


Figura 27. Distribución de tamaños por volumen de los nanogeles NIPAAm:PEGMAM(70:30)/DVA_{1%} liofilizados y reconstituidos.

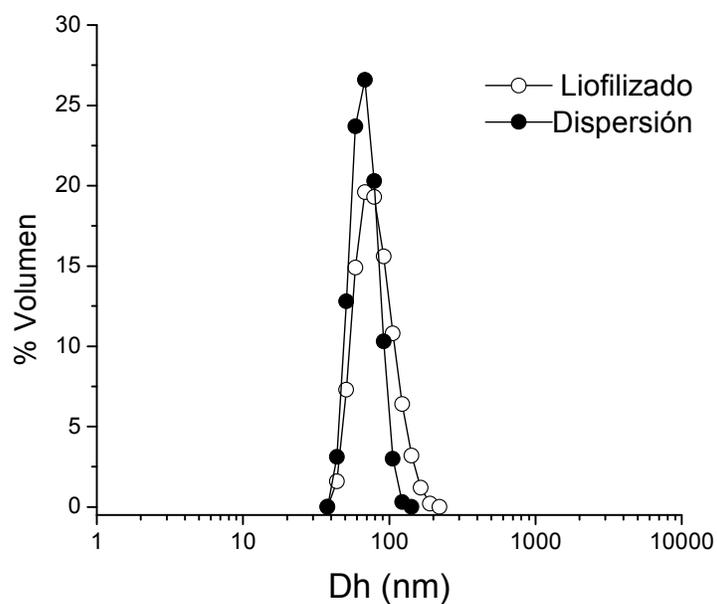


Figura 28. Distribución de tamaños por volumen de nanogeles entrecruzados con DVA_{5%} liofilizados y reconstituidos.

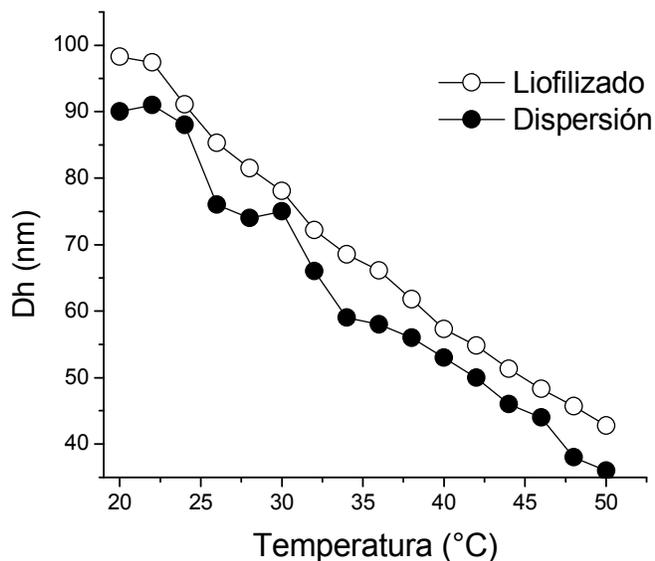


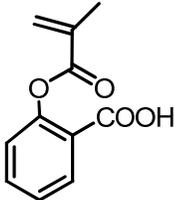
Figura 29. Efecto de la temperaturas en el Dh de nanogeles entrecruzados con DVA_{5%} liofilizados y reconstituidos.

Con base a los datos obtenidos en relación al tamaño de partícula y la estabilidad a los proceso de liofilizado y reconstitución, se pueden realizar experimentos con proporciones de entrecruzante al 5%mol para continuar las síntesis de nanogeles en donde se incorporarán grupos aniónicos al núcleo de los nanogeles, mediante reacciones de polimerización en emulsión sin detergente copolimerizando con MAOB.

IV.3 SÍNTESIS DEL MONÓMERO METACRILILOXI-O-BENZOICO (MAOB)

El monómero ácido se obtuvo como un sólido blanco esponjoso del cual se obtuvo un rendimiento del 50%, se caracterizó por FTIR y H¹RMN (Anexo 1 y 2); obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 12.

Tabla 12. Datos de los espectros y rendimiento de la síntesis del MAOB.

Estructura	Grupo Funcional	FT-IR (cm ⁻¹)	H-NMR (ppm)
	O-H		9.2, s (1H)
	=C-H (aromático)	3079	8.2-7.0, m (4H)
	α-CH ₃ (C-H)	2985	2.1, 2(3H)
	C=O (éster)	1736	
	C=O (ácido)	1694	
	H ₂ C=C	1637	6.5, 5.8, s (2H)
	C-O	1119	
	C=C (aromático)	1455	
	C-O-H	1409	
	C-O (ácido)	1297	

En el espectro FTIR se observó una banda ancha para el estiramiento O-H del grupo ácido (desde aprox. 2550 hasta 3300 cm⁻¹), estiramiento C=O del grupo éster (1736 cm⁻¹), estiramiento C-H aromático (3079 cm⁻¹), estiramiento C-H alifático (2985, 2876 cm⁻¹), estiramiento C=O del grupo ácido (1694 cm⁻¹), estiramiento C=C vinílico (1637 cm⁻¹), estiramiento C=C aromático (1455 cm⁻¹), la flexión C-O-H (1409 cm⁻¹), y el estiramiento C-O del grupo ácido (1119 cm⁻¹).

El espectro de ¹H-RMN (200 MHz) se obtuvo en CDCl₃. A continuación se indica el desplazamiento químico, la multiplicidad, la integración de protones y el grupo funcional correspondiente a cada señal obtenida: δ(ppm) 2.1 (dd, 3H, $J_2=1.54$, -CH₃); 7.0 (dd, 1H, $J_1=J_2= 1.19$, orto-ArH respecto al metacrilato); 8.2 (dd, 1H, $J_1=J_2=1.75$, orto-ArH respecto al grupo ácido). Las señales de los protones vinílicos se asignaron tomando en cuenta que el acoplamiento *trans* es mayor, además, el H en posición *cis* está en mayor contacto con el disolvente y por lo tanto más desplazado.

Las señales de los protones aromáticos se asignaron de acuerdo al efecto protector del metacrilato y desprotector del grupo ácido.

IV.4 SÍNTESIS DE NANOGELES NÚCLEO-CORAZA DE NIPAAm/MAOB VÍA POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN SIN DETERGENTE

La síntesis de nanogeles con núcleo ácido y coraza de polietilenglicol se llevó a cabo con la finalidad de estudiar la incorporación al núcleo del grupo aniónico (MAOB) y el efecto en la temperatura de transición con el pH. Se estudió la incorporación del grupo ácido anfifílico (MAOB) para analizar la interacción con fármacos y este grupo aniónico, mediante puentes de hidrógeno o interacciones iónicas para optimizar el cargado de fármacos.

En los experimentos de síntesis para nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB, se obtuvieron tres emulsiones con aspecto diferente cada una, la intensidad del color blanco lechoso aumentó de acuerdo con el aumento en peso de MAOB. Con los experimentos del grupo de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB, se obtuvieron tres emulsiones con aspecto diferente cada una; se observa un líquido blanco lechoso de acuerdo con la proporción de MAOB; la turbidez aumentó al aumentar la concentración de MAOB en la alimentación.

IV.4.1 Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Las emulsiones obtenidas en los experimentos se caracterizaron vía DLS, determinando los tamaños de partícula (D_h) en función a la temperatura y analizando el número de distribuciones; estos resultados se pueden observar en la Tabla 13.

Tabla 13. D_h de los nanogeles entrecruzados con EGDMA y DVA a 26°C.

Código de muestra	NIPAAm:PEGMAM (%W/W)	Entrecruzante	MAOB (% mol)	D_h (nm) 26°C
M16	70:30	EGDMA	5%	527 ± 70
M12			10%	383 ± 60
M10			15%	342 ± 45
AM1		DVA	5%	48 ± 8
AM7-AC31			10%	97 ± 10
AM6-AM2			15%	239 ± 20

En la tabla 13 se observa que, en nanogeles entrecruzados con EGDMA, a mayor concentración de MAOB disminuye el D_h de las partículas (Figura 30); a diferencia de los nanogeles entrecruzados con DVA donde se observa que a mayor proporción de MAOB, aumenta el D_h de los nanogeles (Figura 31). En cuanto a la comparación de tamaños con respecto al efecto del entrecruzante, se observa que los nanogeles entrecruzados con DVA se obtienen con menor D_h en comparación con nanogeles entrecruzados con EGDMA (Figura 32), presentando ambos grupos distribuciones monomodales de tamaños, lo cual indica la formación uniforme de los

nanogeles. Con respecto al efecto de la temperatura, se observa en ambos grupos de nanogeles, una transición de fase continua (Figuras 33 y 34).

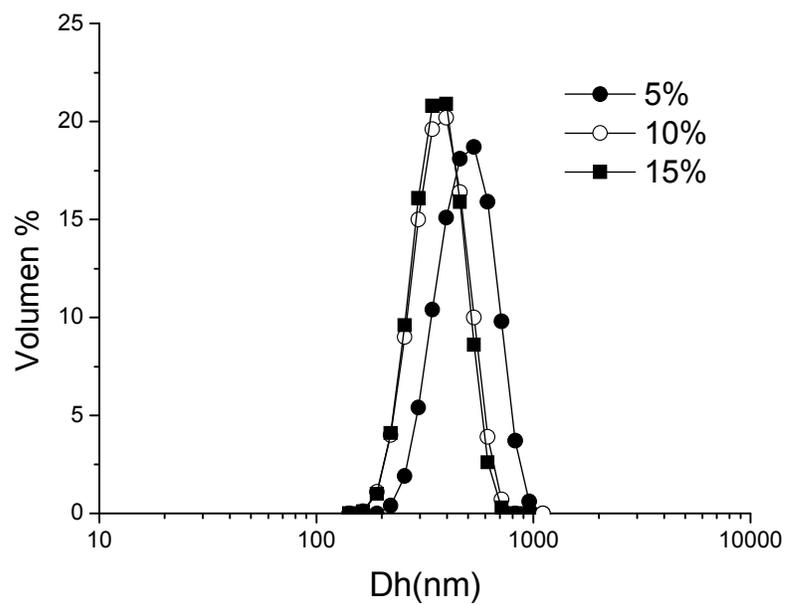


Figura 30. Distribución de tamaños por volumen de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB a 26°C.

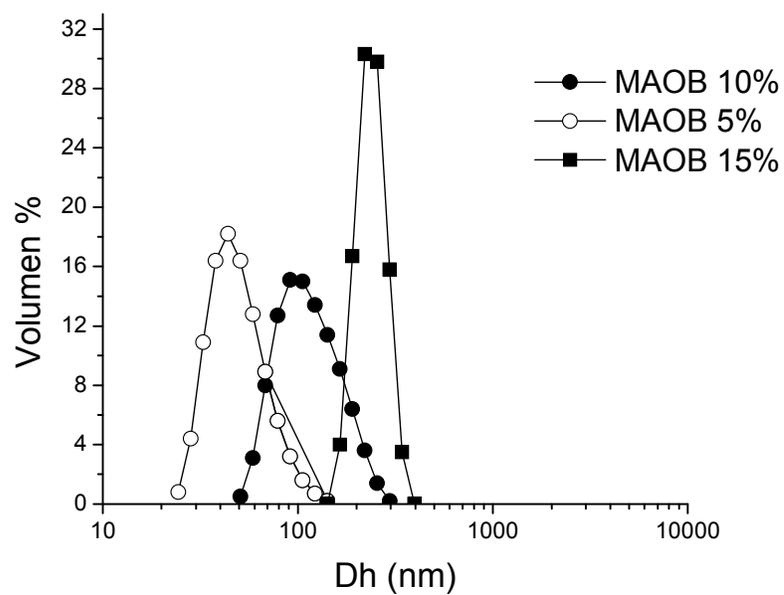


Figura 31. Distribución de tamaños por volumen de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB a 26°C.

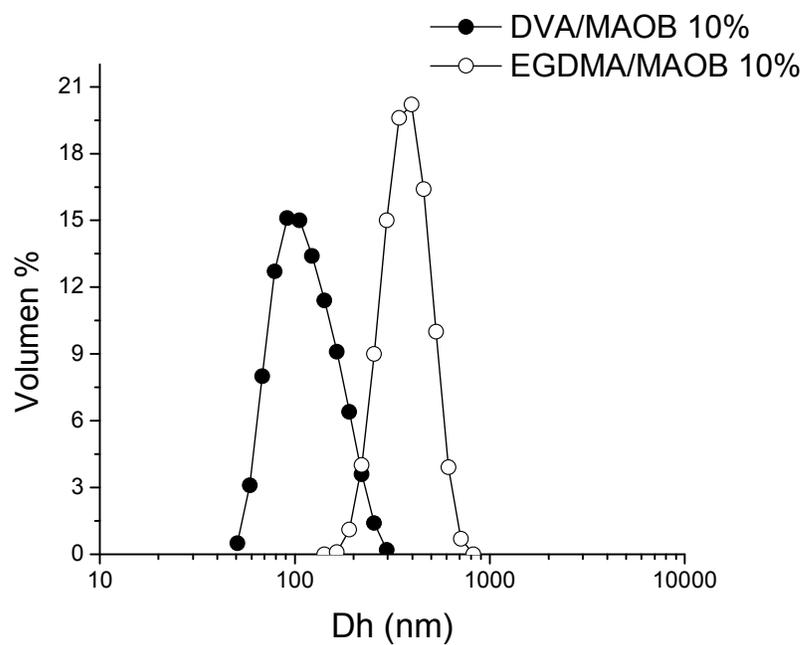


Figura 32. Distribución de tamaños por volumen a 26°C de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB y NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB.

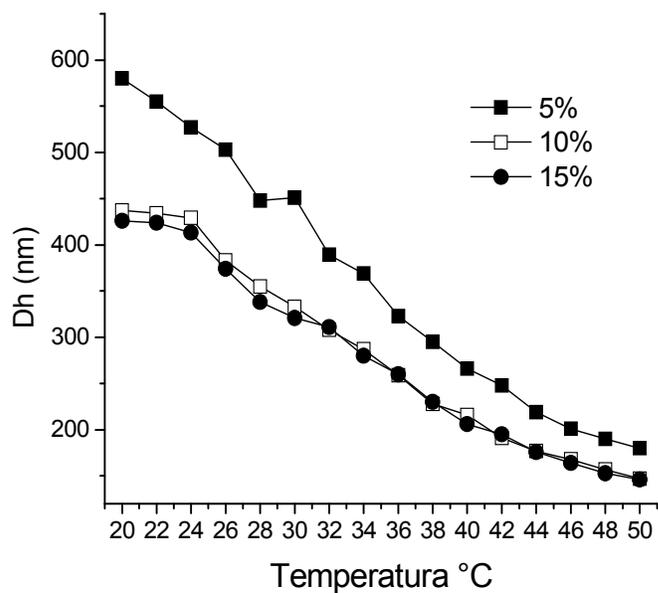


Figura 33. Efecto de la temperatura de nanogeles NIPAAm/PEGMAM/EGDMA variando las proporciones de MAOB.

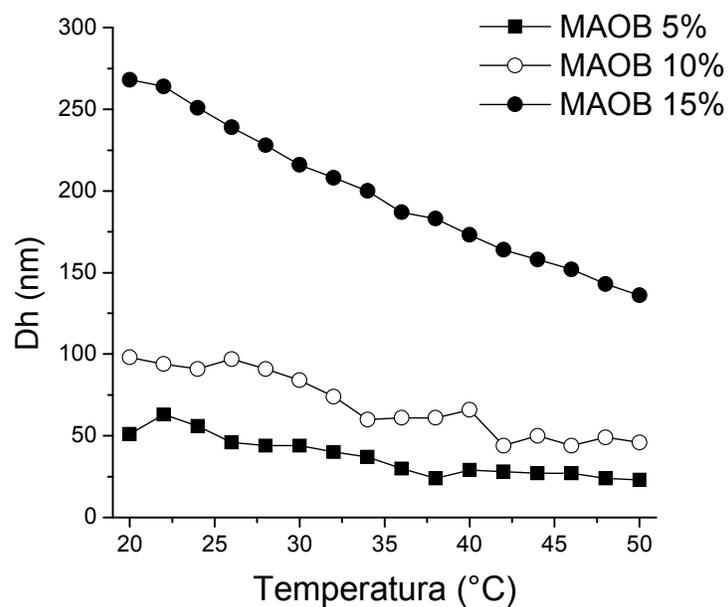


Figura 34. Efecto de la temperatura de nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA variando las proporciones de MAOB.

Uno de los objetivos de la incorporación del grupo ácido en los nanogeles fue modificar la temperatura de transición de la NIPAAm, y como se puede observar en las gráficas de intensidad contra temperatura (Figuras 35 y 36) se presenta un cambio abrupto de la temperatura de transición cercano a los 37°C. Esto es, a dicha temperatura hay un aumento en la intensidad de dispersión de la luz, ya que los nanogeles por arriba de esta temperatura se colapsan, disminuyendo su diámetro hidrodinámico y por lo tanto, aumentando la dispersión e intensidad de la luz.

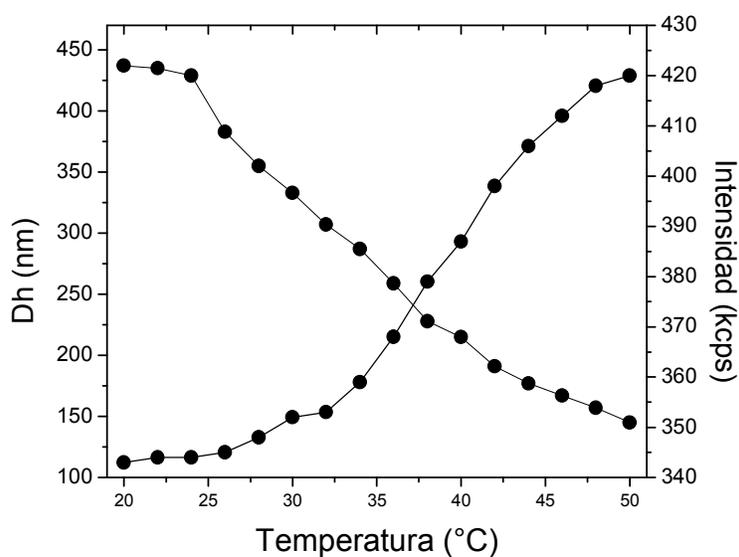


Figura 35. Efecto de la temperatura en el Dh y LCST de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB_{10%mol}.

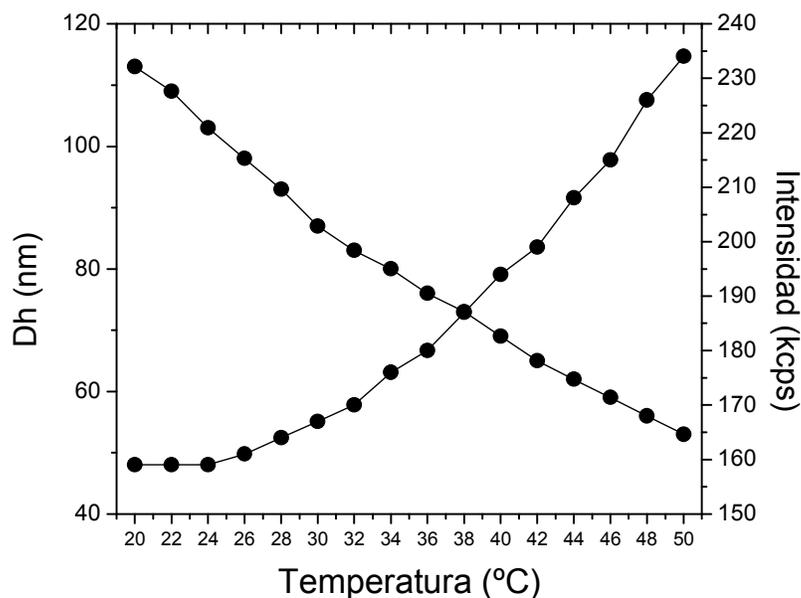


Figura 36. Efecto de la temperatura en el Dh y LCST de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB_{10%mol}.

Con los resultados anteriormente descritos, podemos concluir que los nanogeles entrecruzados con EGDMA y con proporciones de MAOB del 10 y 15% mol, presentaron un menor tamaño de partícula, en comparación con los nanogeles preparados con MAOB_{5%mol}; en cambio en los nanogeles entrecruzados con DVA se logró obtener nanogeles de menor Dh con MAOB_{5%mol} en comparación con MAOB_{15%mol}. Con base a estos resultados, se analizará la estabilidad al proceso de liofilizado y de reconstitución; además se caracterizará el efecto al pH para el grupo de nanogeles con proporciones de MAOB del 10 y 15%mol.

IV.4.2 Liofilización y reconstitución de nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/MAOB

Se realizaron estudios de estabilidad o resistencia al proceso de liofilizado a nanogeles sintetizados y caracterizados de NIPAAm/MAOB. Con la liofilización se logró obtener el rendimiento de los nanogeles, el cual se puede observar en la tabla 14.

Tabla 14. Rendimiento de los nanogeles NIPAAm/PEGMAM/MAOB.

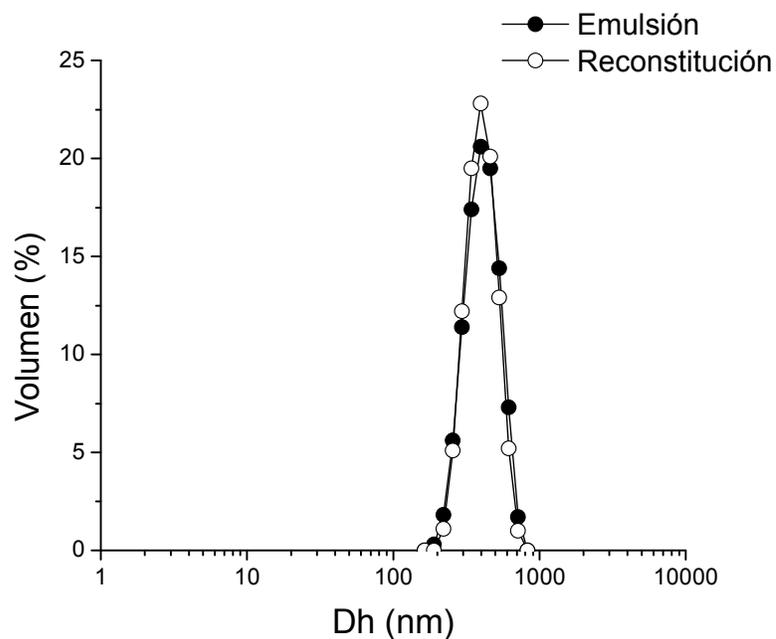
Nanogeles	rendimiento %
EGDMA/MAOB _{5%mol}	92
EGDMA/MAOB _{10%mol}	68
EGDMA/MAOB _{15%mol}	89
DVA/MAOB _{5%mol}	89
DVA/MAOB _{10%mol}	91
DVA/MAOB _{15%mol}	92

Los productos liofilizados se observan como un polvo blanco esponjoso y el polvo reconstituido se observa como un líquido blanco lechoso, el cual se caracterizó vía DLS obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 15. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que los nanogeles de ambos grupos, son estables al proceso de liofilizado ya que se logró obtener la forma y el tamaño original de los nanogeles; esto se puede observar en las distribuciones de tamaños monomodales de los nanogeles reconstituidos de EGDMA/MAOB_{10%mol}, y DVA/MAOB_{10%mol}, (Figura 37 y 38) las cuales nos indican la estabilidad al procesos de liofilizado y reconstitución.

Tabla 15. Dh de los nanogeles liofilizados y reconstituidos de NIPAAm/MOAB a 26°C.

Código de muestra	Entrecruzante	MAOB (% mol)	Dh (nm) 26°C	Dh (nm) 26°C reconstitución
M21	EGDMA	5%	527 ± 70	526 ± 57
M27		10%	383 ± 60	408 ± 50
M17-7		15%	342 ± 45	374 ± 42
DH	DVA	5%	48 ± 8	54 ± 10
DH		10%	97 ± 10	102 ± 8
DH		15%	239 ± 20	260 ± 15

Los resultados de los experimentos previos en relación al tamaño de partícula y a la estabilidad durante los procesos de liofilización/reconstitución, sugieren, que todos los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB y NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB son estables al proceso de liofilizado y de reconstitución.

Figura 37. Distribución de tamaños por volumen a 26°C de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol} /MAOB_{10%mol}

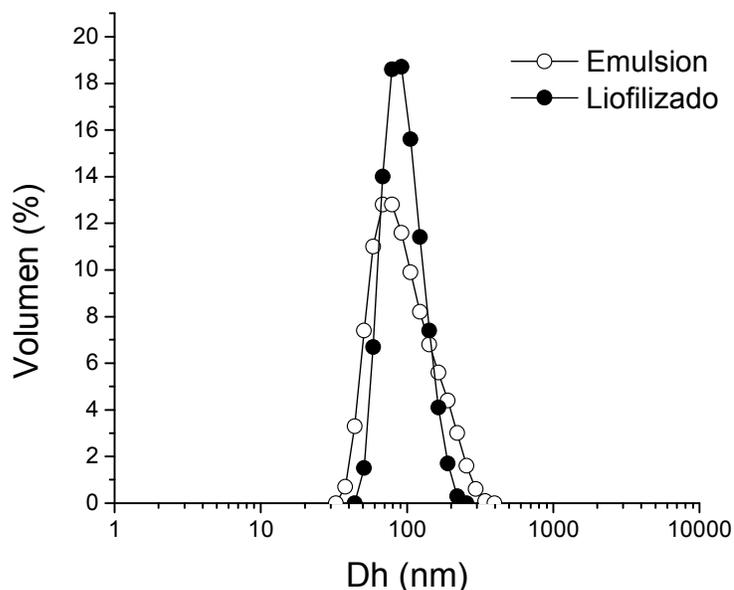


Figura 38. Distribución de tamaños por volumen a 26°C de nanogeles reconstituidos de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol} /MAOB_{10%mol}

Con base a los resultados anteriores, los nanogeles con proporción de MAOB de 10 y 15% mol se consideran idóneos para aplicaciones como el cargado y liberación de fármacos modelo, ya que presentan el tamaño ideal y resisten el proceso de liofilización y reconstitución. Posteriormente se caracterizará el efecto del pH sobre estos nanogeles, para determinar algunas de sus probables aplicaciones biomédicas.

IV.4.3 Determinación del Potencial Z para nanogeles NIPAAm/MAOB

Se utilizó el equipo DTS nano para determinar la carga de la superficie de los nanogeles, el Potencial Z. En la Figura 39 se observa que los nanogeles presentan

un potencial Z negativo debido a los grupos sulfatos del iniciador; a medida que el pH se incrementa el potencial Z disminuye, debido a la ionización de los grupos carboxilo. Hay un cambio drástico del potencial Z a un pH cercano a 5 debido a que a ese pH se encuentra el pKa del MAOB (5.4).⁷⁴

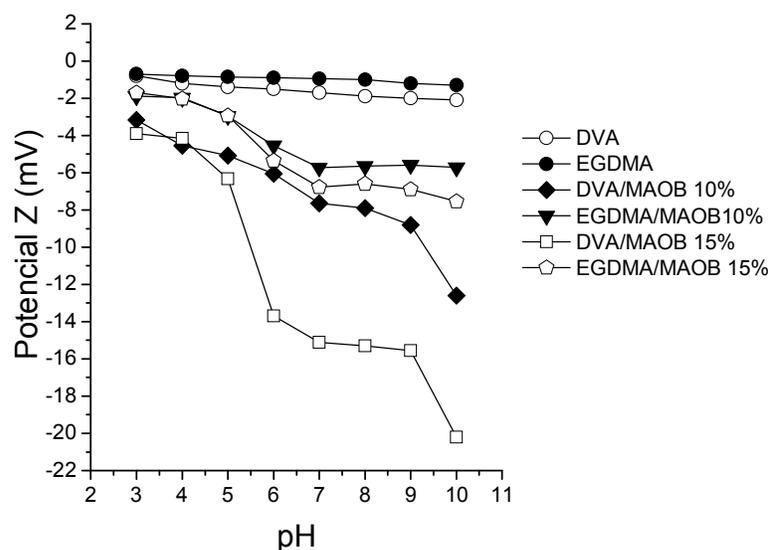


Figura 39. Potencial Z de los nanogeles en diferentes proporciones de MAOB.

IV.4.4 Determinación del MAOB incorporado en los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante titulaciones ácido-base

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de ácido incorporado al núcleo de los nanogeles, se utilizó el método de retrotitulación ácido-base. Se obtuvo la curva de titulación y la curva de la derivada del pH (Anexo 3) para cuantificar la cantidad de MAOB (los cálculos se muestran en el Anexo 4). Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Cantidad de MAOB incorporado al núcleo de los nanogeles.

%w/w Esperado	%w/w Esperado	%w/w Obtenido
EGDMA/MAOB 5%	6	7.5
EGDMA/MAOB 10%	10	10.3
EGDMA/MAOB 15%	14.5	12.9
DVA/MAOB 5%	5.4	5.1
DVA/MAOB 10%	10	12.5
DVA/MAOB 15%	14.5	14

En los resultados anteriores se observa que el peso del ácido obtenido en las retrotitulaciones, concuerda con el peso de ácido en la alimentación, indicando una eficiente incorporación del ácido a los nanogeles.

IV.4.5 Caracterización de los nanogeles núcleo-coraza de NIPAAm/MAOB por su efecto con el pH vía DLS

El grupo de los nanogeles sintetizados con composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB₁₀ y 15%mol y NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB₁₀ y 15%mol, se caracterizaron expuestos a diferentes valores de pH (3 a 10) mediante DLS con el fin de analizar el efecto del pH en la temperatura de transición, y verificar su aplicabilidad a sistemas biológicos, tales como la sangre y células tumorales.

En el grupo de nanogeles con EGDMA/MAOB_{10%mol}, (Figura 40) podemos observar que con el efecto a pH ácido (6 a 3) hay disminución en el tamaño, esto

es el colapso de los nanogeles por efecto del núcleo ácido (MAOB) no ionizado, y presentando una transición de fase continua con la temperatura.

Con el efecto a pH básico (8 a 10) y con solución amortiguadora pH 7.4, se producen un hinchamiento de los nanogeles debido a la ionización de las cargas del MAOB resultando el efecto de Donnan, y presentando una transición de fase continua con la temperatura.

En la Figura 41 se muestra el efecto de la temperatura en los nanogeles con MAOB al 15%mol, en este caso también se observan cambios a diferentes valores de pH; en solución amortiguadora pH 7.4 los nanogeles se hinchan y a pH más básicos se rompen por la fuerza iónica del medio; (esto ocurre con el aumento de concentración de MAOB); en medios ácidos los nanogeles pasan de un estado hidrofóbico o precipitado, disminuyendo su D_h ya que los nanogeles no presentan algún grado de ionización.

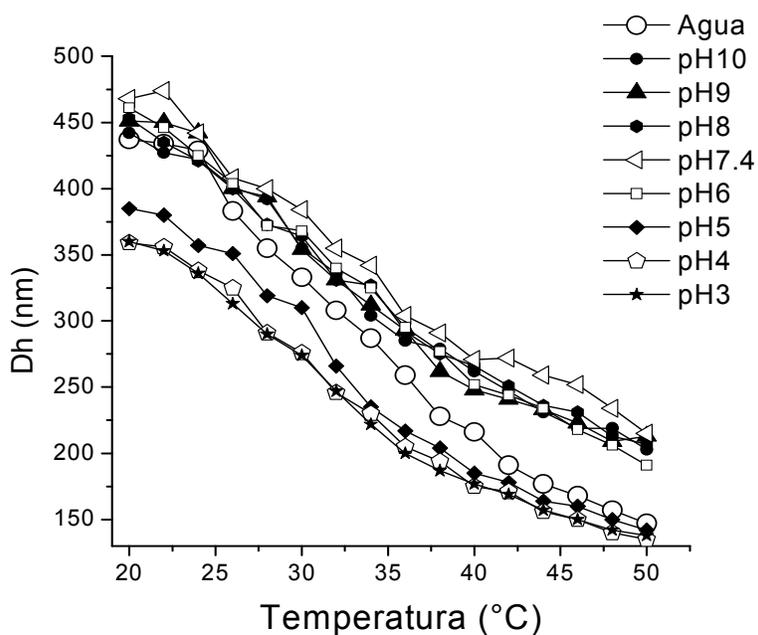


Figura 40. Efecto del pH y la temperatura en el Dh en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/MAOB_{10%mol}/EGDMA_{5%mol}.

En el grupo de nanogeles con DVA/MAOB_{10%mol} y DVA/MAOB_{15%mol} (Figura 42 y 43), se observó que a pH ácido disminuye el tamaño de los nanogeles, debido a su colapso por efecto del núcleo no ionizado (MAOB), obteniendo una transición de fase continua con el efecto de la temperatura. A pH básico y en solución amortiguadora pH 7.4, los nanogeles con proporción de MAOB al 15%mol, no presentaron resistencia a la fuerza iónica en el medio ya que estos poseen una concentración mayor de MAOB y con ello, se obtuvieron distribuciones multimodales de tamaños; con nanogeles al 10% mol de MAOB se logró una resistencia al pH 7.4, este hecho favorece su aplicación a sistemas biológicos.

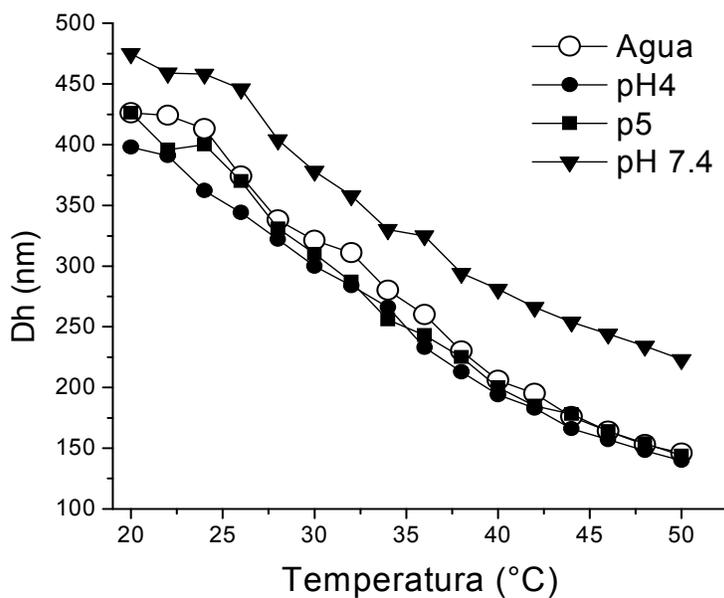


Figura 41. Efecto del pH y la temperatura en el Dh de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA/MAOB_{15%mol}.

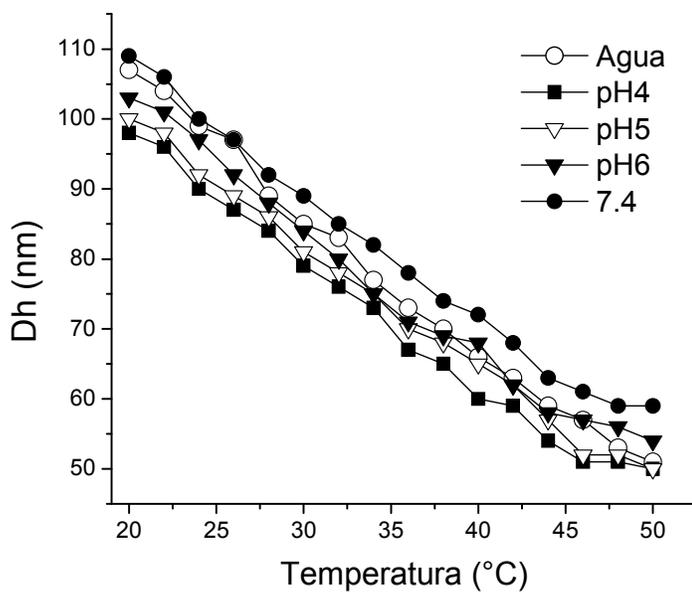


Figura 42. Efecto del pH y la temperatura en el Dh en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB_{10%mol}.

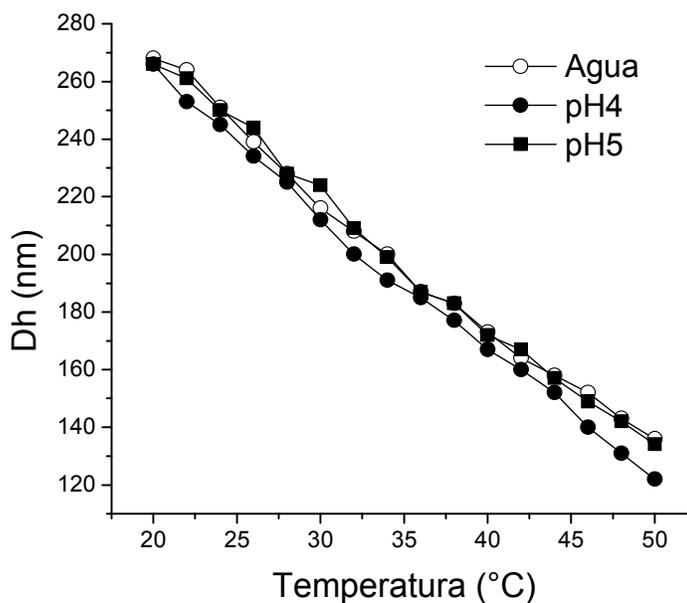


Figura 43. Efecto del pH y la temperatura en el Dh en nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA/MAOB_{15%mol}

En conclusión, en cuanto al efecto del pH, sólo con nanogeles EGDMA/MAOB_{10%mol} se obtuvo un buen grado de hinchamiento a pH arriba de 6. Los nanogeles DVA/MAOB_{15%mol}, no resistieron la fuerza iónica, pero si se obtuvo un colapso de los nanogeles a pH ácidos; los nanogeles DVA/MAOB_{10%mol} resistieron a la fuerza iónica del pH 7.4 y se colapsaron a pH ácidos. Por lo tanto, para aplicaciones de cargado y liberación de fármacos en sistemas biológicos, se caracterizará su estabilidad a procesos de liofilizado y de reconstitución, además se caracterizarán vía AFM, TEM y DSC para analizar la morfología y la composición a nanogeles NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} y NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{10%mol}.

IV.4.6 Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para la caracterización de los nanogeles por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), se utilizó un calorímetro TA instruments, MDSC 2920 modulado, obteniendo los siguientes resultados:

En las Figuras 44 y 45 se presentan los termogramas de los dos grupos de nanogeles, en las cuales se pueden observar las transiciones vítreas (T_g) de los materiales que componen a los nanogeles. En la Figura 44 se observa el termograma de nanogeles entrecruzados con EGDMA; una transición se observa a 6°C correspondiente a una fase rica de polietilenglicol y otra transición se observa a 93°C la cual corresponde a la T_g de la fase rica en pNIPAAm. Considerando que la T_g de la pNIPAAm es de 110°C podemos concluir que el núcleo está formado en su mayoría por NIPAAm con un poco de entrecruzamiento por PEG.

En la figura 45 se observa el termograma de nanogeles entrecruzados con DVA; una transición se observa a 10°C correspondiente a una fase rica de polietilenglicol y otra transición se observa a 41°C la cual corresponde a la T_g de la fase de pNIPAAm. Considerando que la T_g de la pNIPAAm es de 110°C podemos concluir que el núcleo está formado en su mayoría por NIPAAm con menor proporción de PEG recubriendo la superficie del nanogel.

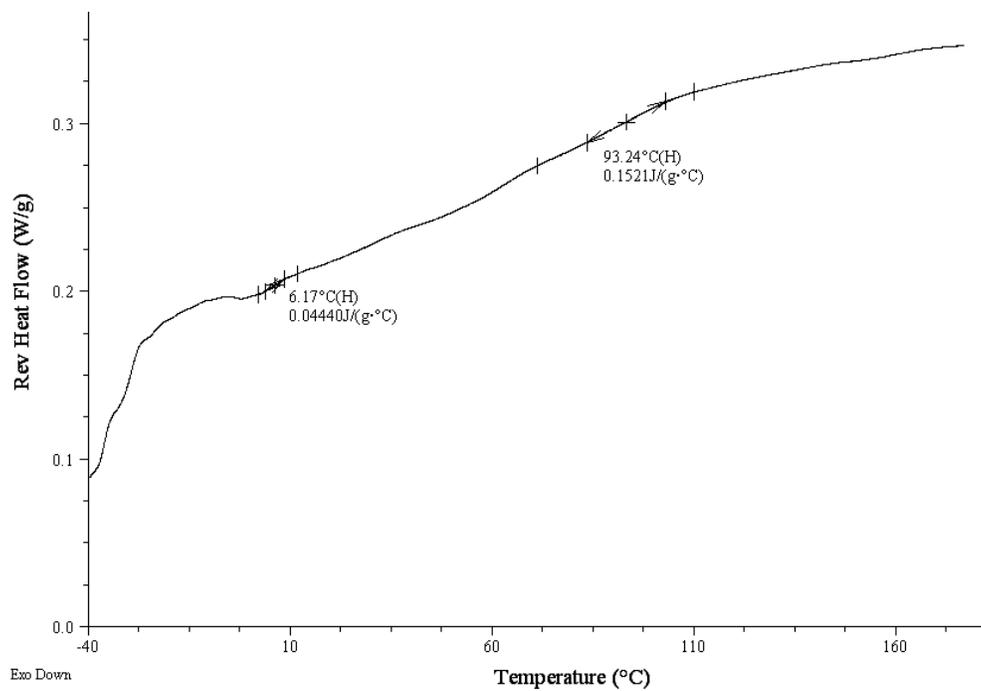


Figura 44. Termograma de nanogeles de NIPAAm//PEGMAMA/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}

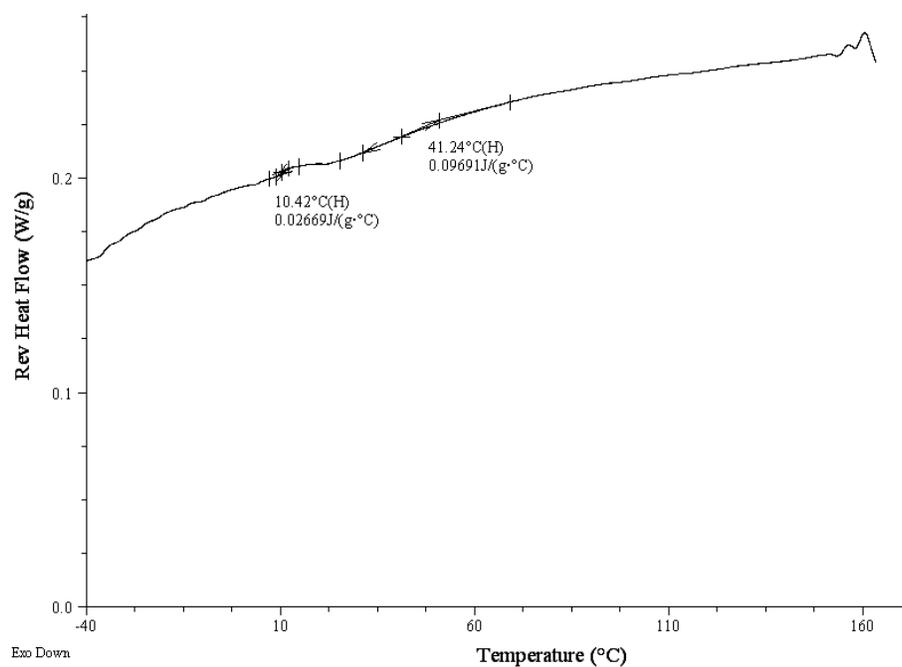


Figura 45. Termograma de nanogeles de NIPAAm//PEGMAMA/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}.

IV.4.7 Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

El análisis microscópico de los nanogeles por AFM, produjo imágenes que permitieron determinar su tamaño y morfología.

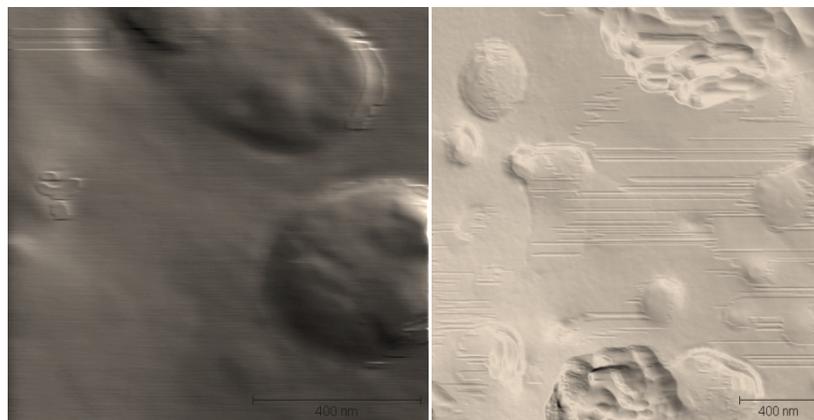


Figura 46. AFM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}

En la Figura 46, se observa el relieve de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%mol}. Esta imagen nos indica la morfología esférica de los nanogeles incluso el tamaño de éstos, que coinciden con los D_h estimados por DLS, que son aproximadamente de 400 nm.

En la Figura 47, se observa el relieve de los nanogeles de composición NIPAAm/DVA_{5%mol}/MAOB_{10%mol}. Esta imagen nos indica la morfología esférica de los nanogeles; el D_h de los nanogeles en la microscopía coincide con la caracterización por DLS, que indica un D_h aproximado de 100 nm para esta composición de nanogeles.

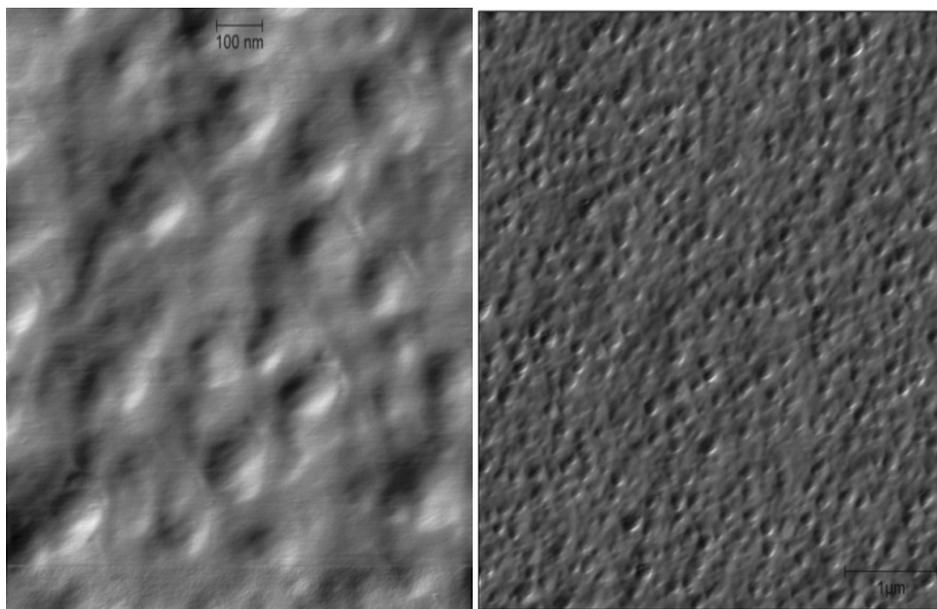


Figura 47. AFM de nanogeles de NIPAAm//PEGMAMADVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}

IV.4.8 Caracterización de los nanogeles de NIPAAm/MAOB mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

En el equipo de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se analizó la presencia de núcleo-coraza en los nanogeles sintetizados, utilizando un colorante radioactivo como agente de contraste. Peppas y colaboradores⁷⁵, proponen que las cargas negativas son afines al colorante radioactivo, por lo tanto ese contraste oscuro que se observa en el núcleo es el colorante. En conclusión, el núcleo está cargado negativamente.

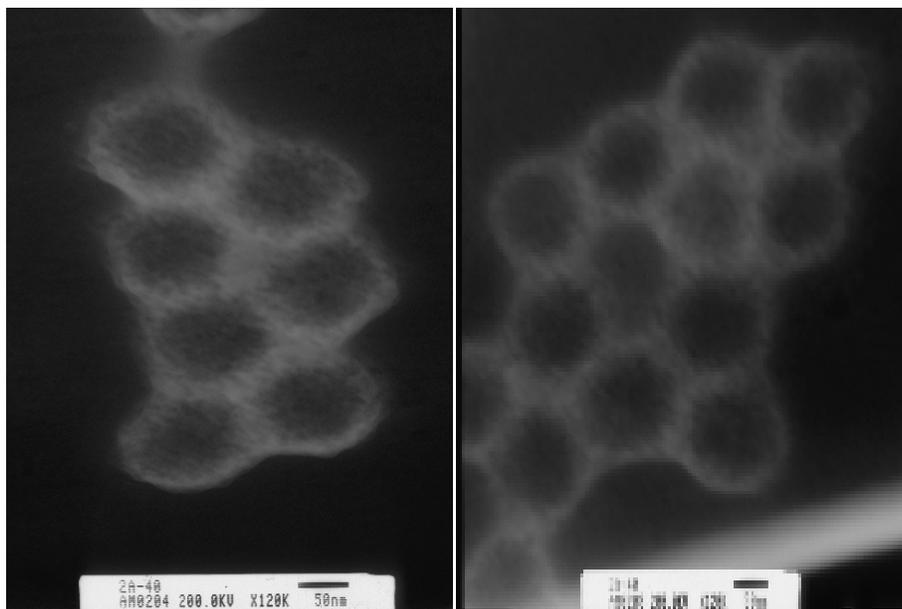


Figura 48. TEM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}

En la Figura 48, se observa la estructura y la arquitectura de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%mol}. Esta imagen nos indica la arquitectura núcleo-coraza formada en los nanogeles, donde claramente se observa la coraza blanca que rodea al núcleo oscuro teñido con el colorante radioactivo; el diámetro de los nanogeles en la microscopía, coincide con la caracterización por DLS, que indica un D_h a 40°C de aproximadamente 200 nm para esta composición de nanogeles.

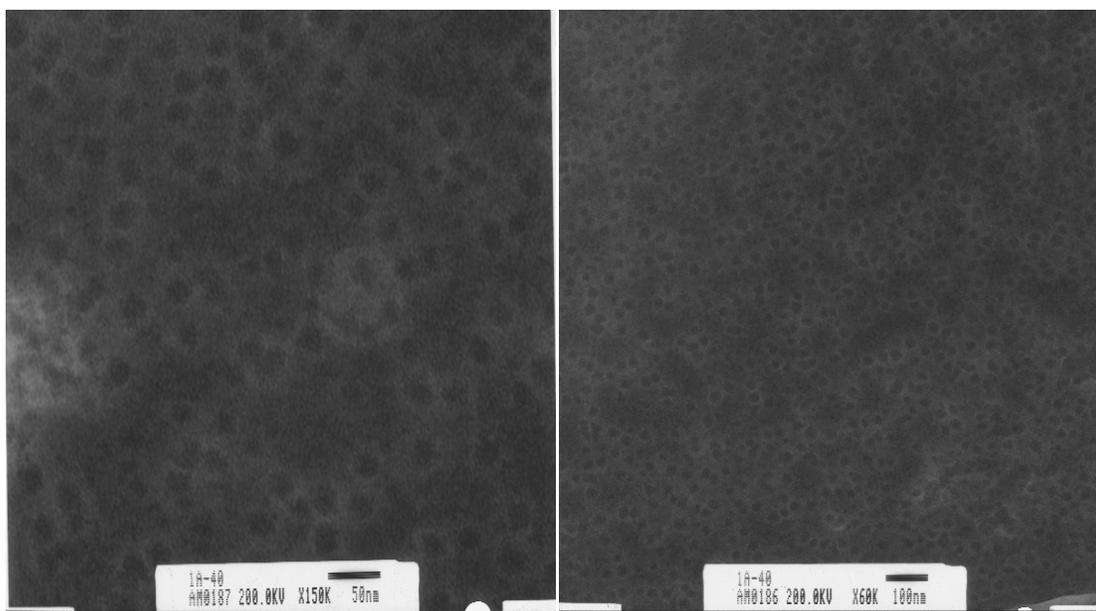


Figura 49. TEM de nanogeles de NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}

En la Figura 49, se observa la estructura y la morfología de los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{10%mol}. Esta imagen nos indica la arquitectura núcleo-coraza formada en los nanogeles; el diámetro de los nanogeles en la microscopía coincide con la caracterización por DLS, que indica un D_h a 40°C de aproximadamente 40 nm para esta composición de nanogeles.

IV.5 SÍNTESIS A GRAN ESCALA DE NANOGELES NIPAAm/MAOB VÍA POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN SIN DETERGENTE

Después de analizar los resultados anteriormente expuestos, se procedió a realizar la síntesis a gran escala de nanogeles con núcleo ácido y coraza de polietilenglicol, para evaluar la factibilidad de producción de altas cantidades

nanogeles con el propósito de realizar experimentos de cargado con diversos fármacos.

En los experimentos de síntesis a gran escala de nanogeles de NIPAAm/MAOB, se obtuvieron dos emulsiones de 1L con aspecto blanco lechoso cada una, las cuales se caracterizaron vía DLS para determinar el tamaño de los nanogeles sintetizados a gran escala y compararlos con los nanogeles sintetizados en volúmenes de 50 mL y evaluar si existe alguna modificación en su tamaño (Tabla 17).

Tabla 17. Dh de los nanogeles sintetizados a gran escala.

Nanogeles	Dh (nm) 26°C	Dh (nm) 26°C a gran escala
NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	383± 60	397±50
NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{15%mol}	97± 10	107±8

En la Figura 50 se puede observar el tamaño de los nanogeles sintetizados a gran escala de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}, aproximadamente de 400 nm, a 26°C, el cual es similar a los nanogeles sintetizados en 50 mL, esto indica que no hay modificación o variación significativa en el tamaño, en las distribuciones y en la morfología.

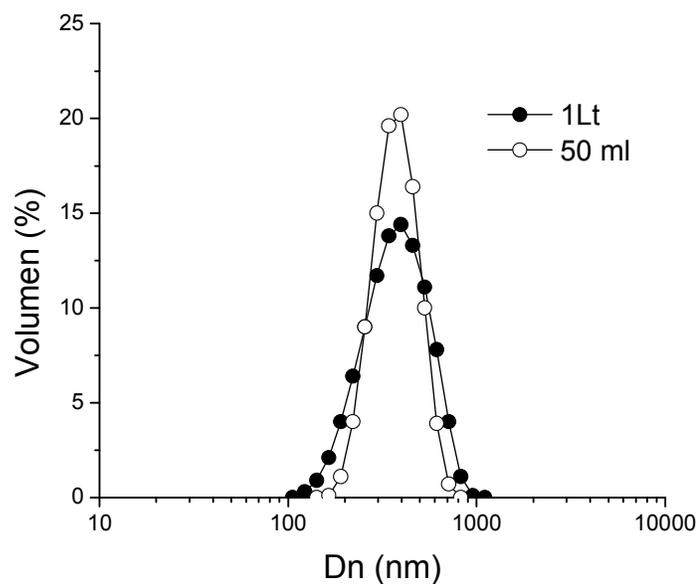


Figura 50. Dh a 26°C de nanogeles sintetizados a gran escala de NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} comparados con los nanogeles sintetizados en 50 mL de agua.

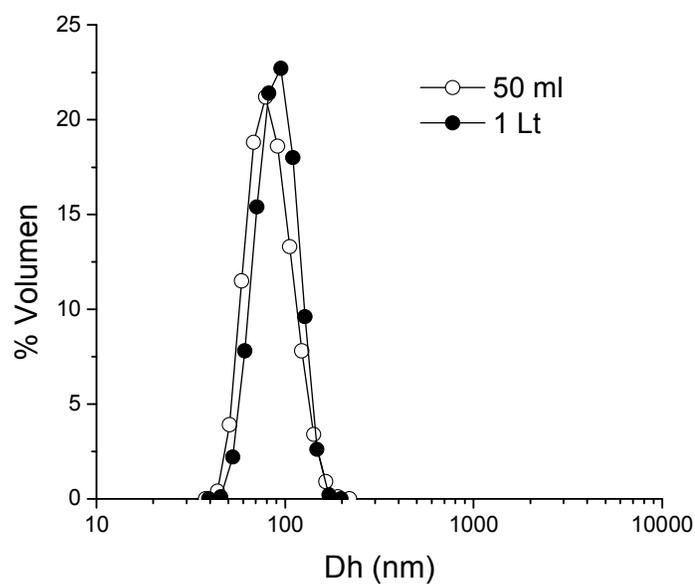


Figura 51. Dh a 26°C de nanogeles sintetizados a gran escala de NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} comparados con los nanogeles sintetizados en 50 mL de agua.

En la Figura 51 se puede observar el tamaño de los nanogeles sintetizados a gran escala de NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}, aproximadamente de 100 nm, el cual es similar a los nanogeles sintetizados en 50 mL. Esto indica que no hay modificación o variación alguna en el tamaño, en las distribuciones y en la morfología.

Con base a estos resultados, se puede concluir que es posible reproducir la síntesis de ambos grupos de nanogeles, en reacciones a gran escala, preservando sus propiedades físicas y químicas.

IV.6 CARGADO DE LOS NANOGELES

Los experimentos para incorporar los fármacos modelo a los nanogeles NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} y NIPAAm:PEGMAM (70:30)/DVA_{5%mol}/MAOB_{10%mol} se realizaron variando la temperatura de equilibrio, la temperatura de recuperación y el medio de cargado. Para cuantificar la cantidad de fármaco cargado, se utilizaron los cálculos mostrados en el Anexo 5, con los cuales se obtiene el porcentaje de carga y la eficiencia.

IV.6.1 Cargado de los nanogeles con 5-Fluorouracilo

Los experimentos de cargado con 5-Fluorouracilo se realizaron variando las condiciones del método, tales como la temperatura y la naturaleza del medio.

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo con los cálculos utilizados en el Anexo 5 y la curva de calibración obtenida por HPLC (Anexo 6).

Tabla 18. Eficiencia de carga y % de carga en nanogeles cargados con 5-FU.

Nanogeles	%Eficiencia	%Carga
NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{10%mol}	43	15
NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{10%mol}	46	16

Las condiciones para estos experimentos fueron diferentes para cada composición de nanogeles. Para nanogeles entrecruzados con EGDMA el medio de equilibrio fue solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 a 20°C y la recuperación a 42°C; para los nanogeles entrecruzados con DVA, el medio de equilibrio fue agua destilada a 20°C y la recuperación a 20°C. Con los resultados obtenidos, se puede observar que ambos grupos de nanogeles poseen la misma capacidad de al fármaco ya que no tienen diferencia significativa en la eficiencia y el % de carga.

IV.6.2 Curva de calibración del 5-Fluorouracilo por HPLC

Las curvas de calibración del fluorouracilo fueron lineales, con coeficientes de correlación iguales a 0.998 (Anexo 6); obteniendo tiempos de retención entre 6.5-7 minutos, y diferentes cromatogramas utilizando los datos del área bajo la curva de

cada una de las concentraciones. Los coeficientes de variación de los estudios de la repetibilidad fueron inferiores al 2% para las 8 réplicas realizadas. Los métodos resultaron específicos, lineales, precisos y exactos en el intervalo de concentraciones estudiadas.

IV.6.3 Cargado de los nanogeles con Doxorrubicina

Los experimentos de cargado con DOX se realizaron en medio básico a 20°C y la recuperación fue a 20°C para ambos grupos de nanogeles. En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración obtenida por espectrometría UV-VIS (Anexo 7) y con los cálculos utilizados en el Anexo 5.

Tabla 19. Eficiencia de carga y % de carga en nanogeles cargados con DOX.

Nanogeles	%Eficiencia	%Carga
NIPAAm/PEGMAM/EGDMA _{5%mol} /MAOB _{10%mol}	63	46
NIPAAm/PEGMAM/DVA _{5%mol} /MAOB _{10%mol}	45	26

Con base a los resultados obtenidos, se puede concluir que ambos grupos de nanogeles tienen una alta capacidad para cargar fármacos. Esto es debido a las intracciones iónicas entre el núcleo del nanogel con el grupo amino ionizado de la DOX; esto se puede observar en la Figura 51, en donde el precipitado (nanogeles entrecruzados con EGDMA) se observa de color púrpura más intenso en

comparación con el sobrenadante, es decir, que hay mayor concentración de DOX en el precipitado, donde se encuentran los nanogeles que precipitan al cargarse el fármaco.

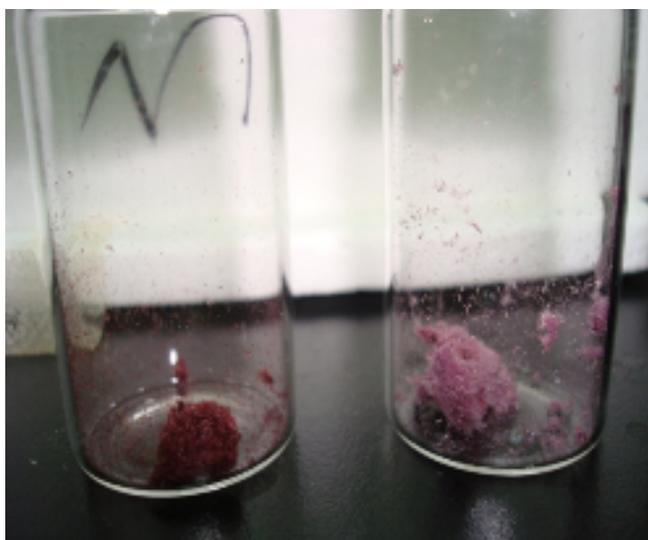


Figura 52. Cargado de nanogeles NIPAAm/PE GMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} con DOX. Precipitado (Izquierda) y sobrenadante (Derecha).

Del mismo modo, en la Figura 52 se puede observar el experimento para cuantificar la cantidad de DOX cargada en los nanogeles. En este experimento se liberó todo el fármaco incorporado en 1 mg de precipitado y en 1 mg de sobrenadante.



Figura 53. Análisis del cargado de los nanogeles NIPAAm/PE GMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} con DOX. Cuantificación de la DOX cargada en 1 mg de sobrenadante (Izquierda) y 1 mg de precipitado (Derecha).

En esta imagen (Figura 53) se observa que en la liberación del fármaco del precipitado hay un aumento en el color rojo-naranja y el sobrenadante se torna rosado; esto es, existe más absorbancia en el precipitado por lo tanto hay mayor concentración en el precipitado. Con esto se puede concluir que los nanogeles sintetizados son muy eficientes para cargar fármacos catiónicos.

En cuanto a los nanogeles entrecruzados con EGDMA, en estos se obtuvo mayor porcentaje de carga en comparación con los nanogeles entrecruzados con DVA, debido a la diferencia de tamaños del núcleo entre ambos grupos de nanogeles.

IV.7 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.

Los experimentos para la liberación controlada de los fármacos modelo incorporados a los nanogeles, se realizaron variando la temperatura de liberación y la naturaleza del medio de liberación, con la finalidad de analizar la aplicación de los nanogeles en la liberación controlada de los fármacos en condiciones fisiológicas normales de circulación sanguínea y condiciones de una célula neoplásicas. Además se analizó la liberación de los fármacos por medio de la degradación de nanogeles entrecruzados con DVA, ya que éste entrecruzante si se expone a pH menores de 6 se hidroliza, rompiendo o degradando a los nanogeles.⁷²

IV.7.1 Degradación del DVA

Se realizaron los experimentos de degradación de nanogeles entrecruzados con DVA; se expusieron a pH 5.5 hasta 48 horas a 42°C. Posteriormente se caracterizaron vía DLS obteniendo tres gráficas de tiempo con respecto al % en volumen contra el Dh. En la Figura 54 se muestran los resultados obtenidos de la degradación. Al comienzo, se observa la medida original de los nanogeles entrecruzados con DVA, sin estar expuestos al pH. A las 24 horas de exposición se observó un ligero cambio en la morfología de los nanogeles. Dos distribuciones de tamaño comienzan a surgir; esto indica que los nanogeles comienzan a romperse. A las 48 horas se observó un cambio más notable, los nanogeles están degradados y además agregados. En conclusión, los nanogeles entrecruzados con DVA se

degradan en 48 horas, expuestos a pH 5.5; y con esto pudiera existir una liberación completa del fármaco en este tiempo.

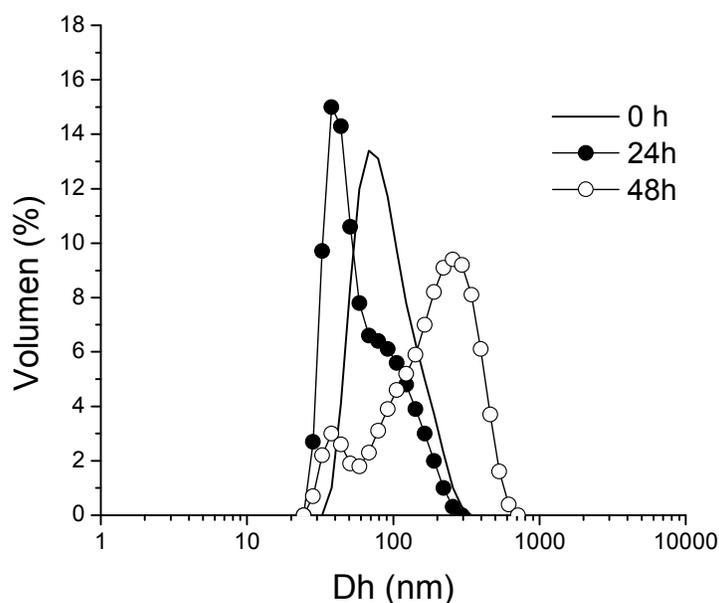


Figura 54. Análisis de la degradación de nanogeles NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} expuestos a pH 5.5

IV.7.2 Estudios de liberación de nanogeles cargados con 5-FU.

El fármaco liberado se cuantificó mediante espectrofotometría UV-VIS utilizando la curva de calibración mostrada en el anexo 10 y para obtener la fracción liberada con respecto al tiempo, se usaron los cálculos mostrados en el anexo 8; se utilizaron blancos de reactivos para comparar la liberación a diferentes condiciones a partir de nanogeles cargados (Anexo 12). Las liberaciones con 5-Fluorouracilo, se realizaron variando la temperatura y el pH; en la Figura 55 se presenta la gráfica de

liberación con nanogeles EGDMA/MAOB en la cual se observa una deficiente liberación en ambas condiciones del medio. A las 6 horas hay una mayor fracción liberada a 37°C a pH 7.4; posteriormente hay una caída en la absorbancia aproximadamente a las 24 horas. Esto nos indica que hay una inestabilidad del fármaco en este medio. En condiciones de pH 5 y 42°C, no hay cambios significativos, sólo que a las 12 horas hay una mayor fracción liberada, entonces en estas condiciones se retrasa la liberación del fármaco.

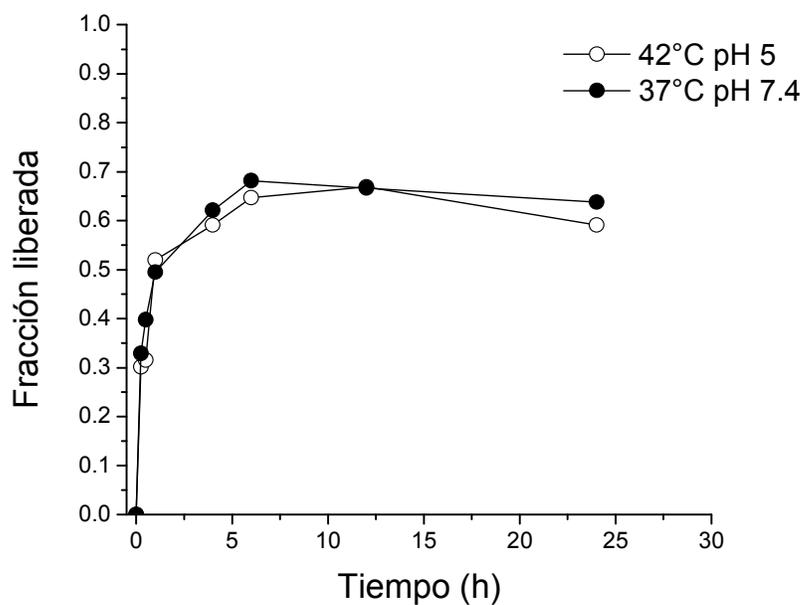


Figura 55. Liberación del 5-Fluorouracilo a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}, a diferentes condiciones.

En la Figura 56 se presenta la gráfica de liberación con nanogeles DVA/MAOB en la cual se observa una deficiente liberación en ambas condiciones del medio, a las 12 horas hay una mayor fracción liberada a 37°C y pH 7.4, y a pH5 y 42°C;

posteriormente hay una caída en la absorbancia, aproximadamente a las 24 h. Esto nos indica que hay una inestabilidad del fármaco en los medios.

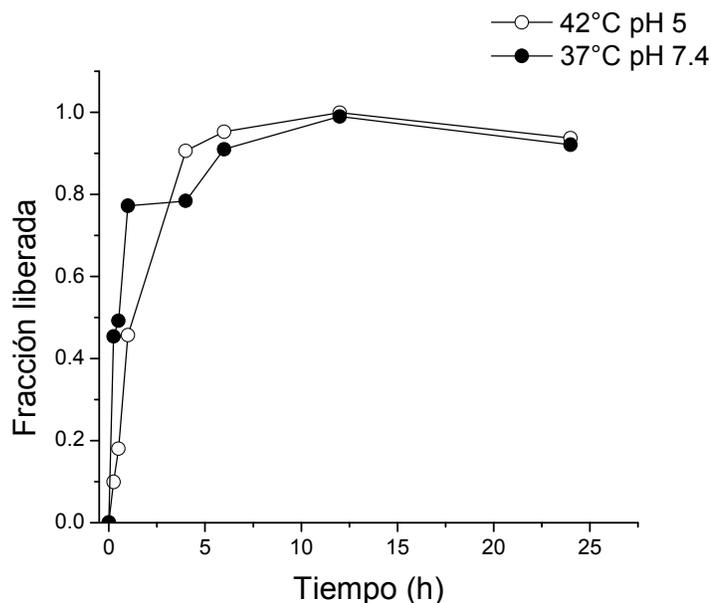


Figura 56. Liberación del 5-Fluorouracilo a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}, a diferentes condiciones.

En conclusión, los nanogeles sintetizados no son eficientes para la liberación con el 5-Fluorouracilo, puesto que no se presenta ningún cambio significativo, bajo ambas condiciones de liberación.

IV.7.3 Estudios de liberación de nanogeles cargados con DOX

Para cuantificar el fármaco liberado por espectroscopía UV-VIS, se utilizó la curva de calibración (Anexo 11) y para obtener la fracción liberada con respecto al tiempo, se utilizaron los cálculos mostrados en el Anexo 9. Se utilizó un blanco con

fármaco para comparar las liberaciones a diferentes condiciones con nanogeles cargados (Anexo 13).

En la Figura 57, se observa una escasa liberación del fármaco. En condiciones de 37°C en solución amortiguadora de fosfatos 7.4, sólo se libera el 35% del fármaco incorporado, a las 24 horas; después de este tiempo, se observa una disminución en la fracción liberada, esto es una disminución en la absorbancia unida a la degradación del fármaco; la DOX es inestable al medio, después de 24hrs de exposición.

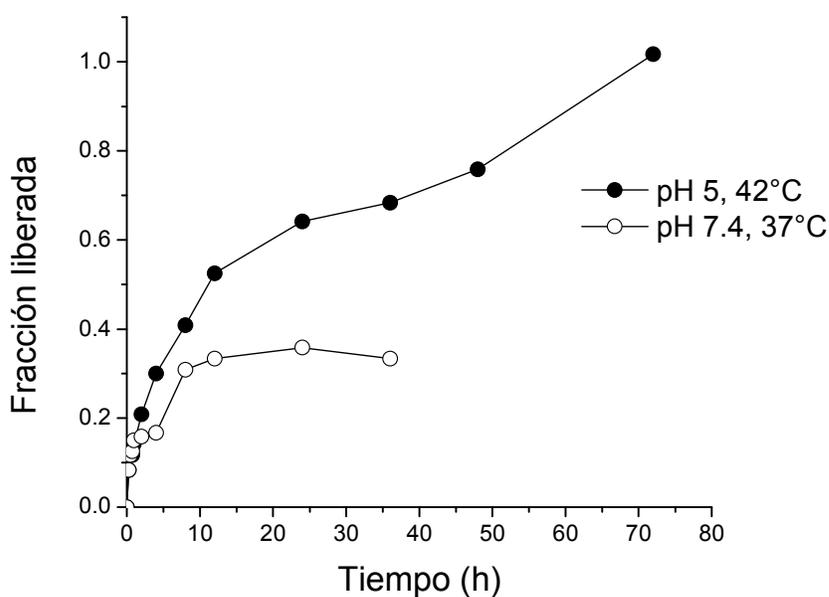


Figura 57. Liberación de la DOX a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol}, a diferentes temperaturas y pH.



Figura 58. DOX incorporada en los nanogeles de composición NIPAAm/PE GMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} después de la liberación a 36 hrs.

Esto también se puede observar en la membrana de diálisis (Figura 58) en la cual se encuentra la mayor parte del fármaco aún incorporado en los nanogeles después de 36 h. En la Figura 57, también se observa una mayor liberación del fármaco en condiciones de 42°C en solución amortiguadora de fosfatos pH 5, ya que a las 72 horas se libera el 100% del fármaco incorporado.

En la Figura 59, se observa una escasa liberación del fármaco en condiciones de 37°C en amortiguador de fosfatos 7.4, sólo se libera el 30% del fármaco incorporado, a las 24h; después de este tiempo, se observa una disminución en la fracción liberada, esto es, la disminución de la absorbancia unida a la degradación del fármaco; la DOX es inestable al medio, después de 24 horas de exposición.

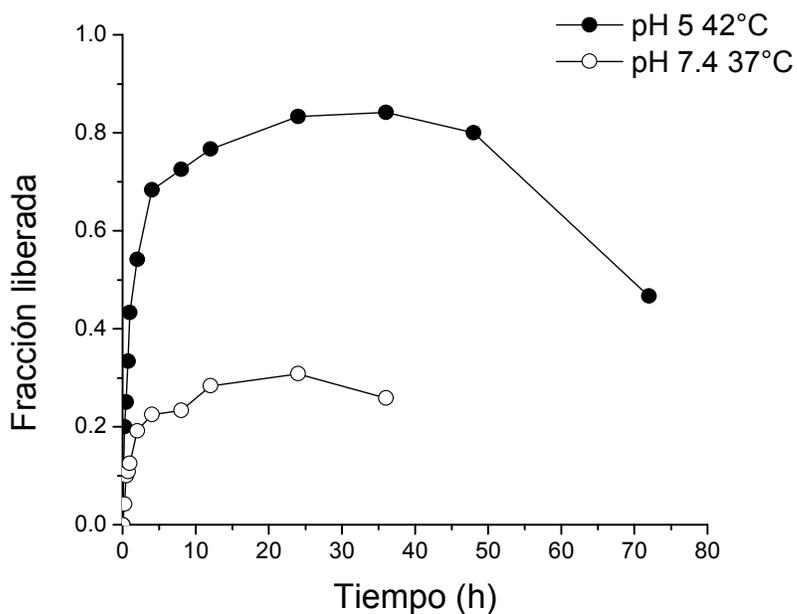


Figura 59. Liberación de la DOX a partir de nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} con DOX, a diferentes condiciones.

Esto también se puede observar en la membrana de diálisis (Figura 60) en la cual se encuentra la mayor parte del fármaco aún incorporado en los nanogeles después de 36 h. En la Figura 59, también se observa una mayor liberación del fármaco en condiciones de 42°C en solución amortiguadora de fosfatos pH 5, ya que se libera el 84% del fármaco incorporado, a las 36 horas.

En condiciones ácidas a 42°C, la liberación del fármaco es más rápida en nanogeles entrecruzados con DVA, comparada con la de los nanogeles entrecruzados con EGDMA. Esto se debe a que el DVA se hidroliza a pH menor de 6. Este punto se comprueba con el experimento de degradación de DVA (Figura 53),

el cual se llevó a cabo exponiendo a los nanogeles a la temperatura de 42°C a pH 5 por 48 horas.



Figura 60. DOX incorporada en los nanogeles de composición NIPAAm/PEGMAM/DVA_{5%mol}/MAOB_{15%mol} después de la liberación a 36 hrs.

Se puede concluir que las condiciones de liberaciones, que resultan de estos estudios son aplicables al área biomédica; los nanogeles podrían mantenerse en circulación sanguínea durante 36 horas sin liberar la mayor parte del fármaco, por lo que pudiera disminuir los efectos adversos del fármaco. Los nanogeles entrecruzados con EGDMA ya incorporados a las células cancerígenas podrían parcialmente liberar todo fármaco aproximadamente a las 72 horas mientras que los nanogeles entrecruzados con DVA incorporados en las células cancerígena podrían liberar todo fármaco en un periodo que oscila entre las 36 y 48 horas.

**CAPÍTULO V
CONCLUSIONES**

Se sintetizaron nanogeles núcleo-coraza, sensibles a la temperatura y al pH; los nanogeles fueron preparados por el método de polimerización en emulsión sin detergente, utilizando a la NIPAAm y un monómero anfifílico el MAOB y PEGMAM como el macrómero estabilizador.

Los nanogeles demostraron características de núcleo-coraza con buena dispersión en solución acuosa. La introducción de grupos ionizables en el núcleo de las nanopartículas permite ajustar la temperatura de transición y ofrecen una ancla para el cargado de solutos de carga opuesta por interacciones iónicas.

El entrecruzante utilizado para preparar los nanogeles tiene un efecto importante en el tamaño de los nanogeles. Los nanogeles más pequeños se obtuvieron con un entrecruzante lábil, el DVA, en comparación con EGDMA. Los nanogeles con baja concentración de entrecruzante no son estables al proceso de reconstitución, y no pueden soportar la presión de Donnan generada por la ionización de los grupos básicos.

El MAOB además de proporcionar grupos aniónicos también ejerce un efecto de emulsificante con respecto a los nanogeles entrecruzados con EGDMA, ya que el MAOB interviene en el D_h de los nanogeles; los nanogeles entrecruzados con EGDMA reduce su D_h al aumentar la concentración de MAOB. En los nanogeles entrecruzados con DVA crece su D_h al aumentar la concentración de MAOB.

El método de síntesis es rápido y eficiente para llevar la síntesis de los nanogeles a gran escala, para obtener una producción masiva. La desventaja del

método es que no es posible obtener nanogeles con alta densidad de entrecruzante debido a la generación de macrogeles.

La síntesis a media escala de los nanogeles (1 litro de reacción), arrojó resultados muy semejantes a los nanogeles sintetizados en un volumen de 50 mL de reacción, en cuanto al D_h y número de distribuciones; por lo que la reproducción de los nanogeles se puede obtener en un solo paso en 1 litro de emulsión, con aproximadamente el 90% de rendimiento.

Los nanogeles sintetizados resultaron dispositivos con alta capacidad para cargar o encapsular los fármacos modelos propuestos en este trabajo. El método de cargado fue optimizado.

Los nanogeles cargados con DOX resultaron óptimos para su posible aplicación biomédica, ya que fue posible obtener una liberación sostenida y óptima en los experimentos realizados *in vitro* bajo condiciones de temperatura y pH esperadas en tumores cancerígenos. Los nanogeles entrecruzados con DVA liberaron la DOX incorporada en menor tiempo en dichas condiciones, ya que los grupos acetales son lábiles a condiciones ácidas lo que lleva a la degradación y ruptura del nanogel.

Los nanogeles cargados con 5-FU, liberaron el fármaco de manera inmediata en condiciones de células normales y en condiciones de células neoplásicas. La cinética de liberación es debida a que el 5-FU es un ácido débil (anión) por lo que existe repulsión con los grupos ácidos del nanogel. Esto demuestra la importancia de

las interacciones iónicas para el cargado y la liberación de fármacos usando materiales poliméricos.

REFERENCIAS

- 1.- Kavanov, A.V., Vinogradov, S.V.; Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem. Int. ed.* **2009**,*48*, 5419-5429.
- 2.- Seymour, L., Strohalm, J., Effect of molecular weight of N-(2-Hidroxypropyl)metacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal and intravenous administration to rats. *J. Biomed Mater Res.* **1987**,*21*,1341-58.
- 3.- Kwon, J., Drumright, R., Siegwart, D., The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in polymer science* **2008**, *33*, 448-477.
- 4.- Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y.; Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv.* **2001**,*47*,113-131.
- 5.- Vinogradov; S.V.; Colloidal microgels in drug delivery applications. *Curr Pharm Des.* **2006**,*12*, 4703-4712.
- 6.- Rzaev,Z., Dincer, S., Piskin, E.; Functional copolymers of N isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Prog. Poly. Sci.* **2007**,*32*, 534-597.
- 7.- Gil, E., Hudson, S.; Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* **2004**,*29*,1173-1222.
- 8.- Vihola, H., Laukkanen, A., Valtola, L.; Studies on thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) based polymers for pharmaceutical applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3055-3064.
- 9.- Pooler,C., Owens, F.; *Introduction to nanotechnology*; John Wiley& sons: New York interscience, 2008; p. 1.
- 10.- Roco M; Williams, R., Alivisatos, P.; *Nanotechnology Research Directions.*; Kluwer Academic Publishers, **2000**, p. 253
- 11.- Rezi, M.; *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*, Springer, **2007**, p 354
- 12.- Malsch, N.; *Biomedical Nanotechnology*; CRC Press. **2005**, pp8.

- 13.- Kabanov, A.V., Alakhov, V.; Hydrogels biological properties and applications. *Ther. Drug Carr. Syst.* **2002**, *19*, 1-72.
- 14.- Otsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka, K.; PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 403-419.
- 15.- Hubbell, J.A.; Lipid and polymer based drug delivery vehicles. *Enhancing drug function, Science*; **2003**, *34*, 595-596.
- 16.- Bontha, S., Kabanov, A., Bronich, T.; Polymer micelles with cross-linked ionic cores for delivery of anticancer drugs. *Journal of Controlled Release.* **2006**, *114*, 163-174.
- 17.- Kwon, G.S., Kataoka, K.; Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 295-309.
- 18.- Woodle, M.; Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. *Advanced drug delivery rev.* **1998**, *32*, 139-152.
- 19.- Tobio, M., Gref, R., Sanchez, A., Langer, R., Alonso, M.J.; Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm. Res.* **1998**, *2*, 270-275.
- 20.- Kabanov, A. and Vinogradov, S.; Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5418-5429
- 21.- Akiyoshi, K., Kobayashi, S., Shichibe, S., Mix, D., Baudys, M., Kim, S. W., and Sunamoto, J.; Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol bearing pullulan as a carrier of protein drugs : complexation and stabilization of insulin. *J Control Release* **1998**, *54*, 313-320.
- 22.- Jung, K., Drumright, R., Siegwart, D., Krzysztow, M.; The development of microgels/nanogels for drug delivery applications; *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 448-477.
- 23.- Aulenta, F., Hayes, W. and Rannard S.; Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 1741-1771.
- 24.- Gillies, E. and Frechet, J. M.; Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 35-43
- 25.- R. Wiwattanapatapee, Lomlim, L. and Saramunee, K; Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid. *J. Control. Release* **2003**, *88*, 1-9

- 26.- Vandamme, T., Brobeck, L.; Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *J. Control Release* **2005**, *10*, 23-38.
- 27.- Li Yan Qiu and You Han Bae; Polymer architecture and drug delivery. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23*, 23-24
- 28.- Lasic, D.D.; Novel applications of liposomes. *TIBTECH*. **1998**, *16*, 307-321.
- 29.- Drummond D., Meyer, O. Hong, K., Kirpotin B.; Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 691-743.
- 30.- Waterhouse D.; Preparation, characterization and biological analysis of liposomal formulations of vincristine. *Methods Enzymol* **2005**, *39*, 140-157.
- 31.- Park, J.; Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* **2002**, *4*, 95-99.
- 32.- Kim, S., Jeong, J., Chun, K., Park, T.; Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)poly(ethyleneglycol)folate conjugate. *Langmuir* **2005**, *21*, 8852-7.
- 33.- Kohler, N., Sun, C., Wang, J., Zhang, M.; Methotrexate modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir* **2005**, *21*, 8858-64.
- 34.- Jensen, G., Davis, M.; Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioc. Chem.* **2003**, *14*, 1122-32.
- 35.- Seymour, L., Duncan, R., Strohm, J., Kopecek, J.; Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21*, 1341-58.
- 37.- Muggli, D., Burkoth, A., Keyser, S., Lee, H., Anseth K.; Reaction behavior of biodegradable, photo-cross-linkable polyanhydrides. *Macromol.* **1998**, *31*, 4120.
- 38.- Martens, P., Bryant, J., Anseth, K.; Tailoring the degradation of hydrogels formed from multivinyl poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) macromers for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 283-92.

- 39.- Kitamura, T., Matsumoto, A.; Facile synthesis of degradable gels by oxygen cross-linking of polymers including a dienyl group on their side chain or at chain ends. *Macromolecules* **2007**,*40*,6143-9.
- 40.- Aliyar, H., Hamilton, P., Ravi, N.; Refilling of ocular lens capsule with copolymeric hydrogel containing reversible disulfide. *Biomacromolecules* **2005**,*6*,204-211.
- 41.- Murthy, N., Thng, Y., Schuck S, Xu, M., Frechet J.; A novel strategy for encapsulation and release of proteins: hydrogels and microgels with acid-labile acetal crosslinkers. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**;*124*,12398-9.
- 42.- Li, Q., Wang, J., Shahani, S., Sun, D., Sharma, B., Elisseeff, J.; Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. *Biomaterials* **2006**,*27*,1027-34.
- 43.- Arshady, R.; Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey. *Colloid and polymer science* **1992**,*270*,712-732.
- 44.- Cawse,J.L., Dispersion polymerization. In: Lovell P., El-Aasser MS, editors. Emulsion polymerization and emulsion polymers. West Sussex, England: Wiley; **1997**. p. 743–61.
- 45.- Zime,M., Lagaly, G., Ahrens, J.; Some aspects of polymer colloids I. Preparation and properties of different types of latex particles. *J. Colloid Polym Sci* **1990**,*268*,924-933.
46. Motokawa, R.; Soap free emulsion polymerization and phase behavior of poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(ethylene glycol) in aqueous media. Chiba university Japan. **2005**, pp 4-5.
47. Henmei, N., Yongzhong, D., Guanghui, M., Masatoshi, N., and Shinzo, O.; Mechanism of soap-free emulsion polymerization of styrene and 4-Vinylpyridine: Characteristics of reaction in the monomer phase, aqueous phase, and their interface. *Macromolecules* **2001**, *34*, 6577-6585.
48. Bastos, D., De las Nieves, F.; Effect of electrolyte type on the electrokinetic behavior of carboxylated polystyrene model colloids. *J. Colloid Polym. Sci.* **1996**, *274*,108-1088.
49. Tamai,H., Fujii, A., Suzawa, T.; Colloidal stability of polymer latices coated with bovine serum albumin. *Colloid Interface Sci.* **1986**, *18*, 176-181.

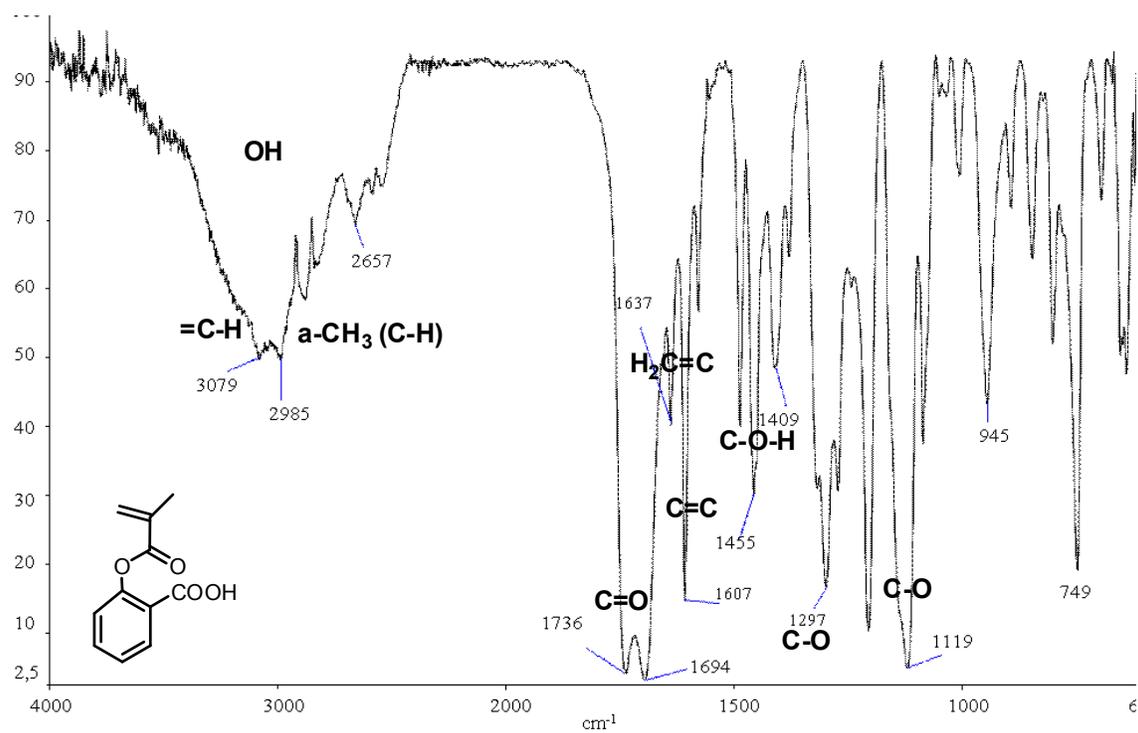
50. Tsubokawa N., Kogura, A.; *J Polym Sci.* **1991**, 29, 269.
51. Webster, J.; *Drug Deliver Systems. Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, Second Edition.* John Wiley & Sons, Inc. **2006**, pp 466.
52. Ruozi, B.; Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *E.J. Pharm Sci.* **2005**,25,81-89.
53. Thode, K., Muller,R., Kresse, M.; Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis-highly sensitive rapid assay for dispersion stability. *J. Pharm. Sci.* **2000**,89,1317-1324.
54. Ford, J., Timmins, P.; *Pharmaceutical thermal analysis techniques and applications.* Southampton: John Wiley & Sons, Inc. **1989**, p.102
55. Venkateswarlu V., Manjunath, K.; Preparation, characterization in vitro and release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J. Control. Rel.* **2005**,95, 627-638.
56. Ramos, R., Velazquez, K., De la Rosa, P.; Atrapamiento de sustancias húmicas en hidrogeles con aplicación en agricultura. *Cienciacierta* **2009**, 20, 56-58.
57. Nagahama, K., Mori, Y., Ohya, Y., Ouchi, T.; Biodegradable nanogel formation of stability by stereocomplexation. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2135-2141.
58. Missirlis, D., Tirelli, N., Hubbell, J.; Amphiphilic hydrogel nanoparticles. Preparation, characterization and preliminary assessment as new colloidal drug carriers. *Langmuir* **2005**, 21, 2605-2613.
59. Oh, J., Siegwart, D., Lee, H., Sherwood, G., Peteanu, L., Hollinger, J., Kataoka, K. Matyjaszewski, K.; Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**,129, 5939-5945.
60. Bronich, T., Bontha, S., Shlyakhtenko, B., Hatton, L., Kabanov, A.; Template assisted synthesis of nanogels from Pluronic-modified poly(acrylic acid). *J. Drug Targeting* **2006**, 14, 357-366.

61. Jin, W., Xu, P., Zhan, Y., Shen, Y., Van Kirk, E., Alexander, B. Murdoch, W., Liu, L., Isaak, D.; Degradable cisplatin-releasing core-shell nanogels from zwitterionic poly(beta-aminoester)-graft-PEG for cancer chemotherapy. *Drug Delivery* **2007**, *14*, 279-286.
62. Khmel'nitsky, Y., Neverova, I., Gedrovich, A., Polyakov, V., Levashov, A. Martinek, K.; Catalysis by α -chymotrypsin entrapped into surface-modified polymeric nanogranules in organic solvent. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 751-757.
63. Hong, J., Gong, P., Xu, D., Dong, L.; Stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 597-605.
64. Ogawa, K., Sato, S., Kokufuta, E.; On an intraparticle complex of cationic nanogel with a stoichiometric amount of bound polyanions. *Langmuir* **2007**, *23*, 2095-2102.
65. Ricka, J., Tanaka, T., Swelling of ionic gels: quantitative performance of the Donnan theory. *Macromolecules* **1984**, *17*, 2916-2921.
66. McAllister, K., Sazani, P., Adam, M., Cho, J., Rubinstein R., DeSimone, J.; Polymeric nanogels produced via inverse microemulsion polymerization as potential gene and antisense delivery agent. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15198-15207.
67. Lee, S., Choi, S., Kim, S., Park, T.; Thermally sensitive cationic polymer nanocapsules for specific cytosolic delivery and efficient gene silencing of siRNA: Swelling induced physical disruption of endosome by cold shock *J. Controlled Release* **2007**, *125*, 25-32.
68. Varga, I., Szalai, I. Meszaros, R., Gilanyi, T., Pulsating pH-Responsive Nanogels *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 20297-20301.
69. Eichenbaum, G., Kiser, P., Simon, S., Needham, D.; pH and Ion-Triggered Volume Response of Anionic Hydrogel Microspheres. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5084-5093.
70. Bruinewoud, H.; Ultrasound-induced drug release from polymer matrices. PhD thesis, Technische Universiteit Eindhoven, **2005**, pp 1

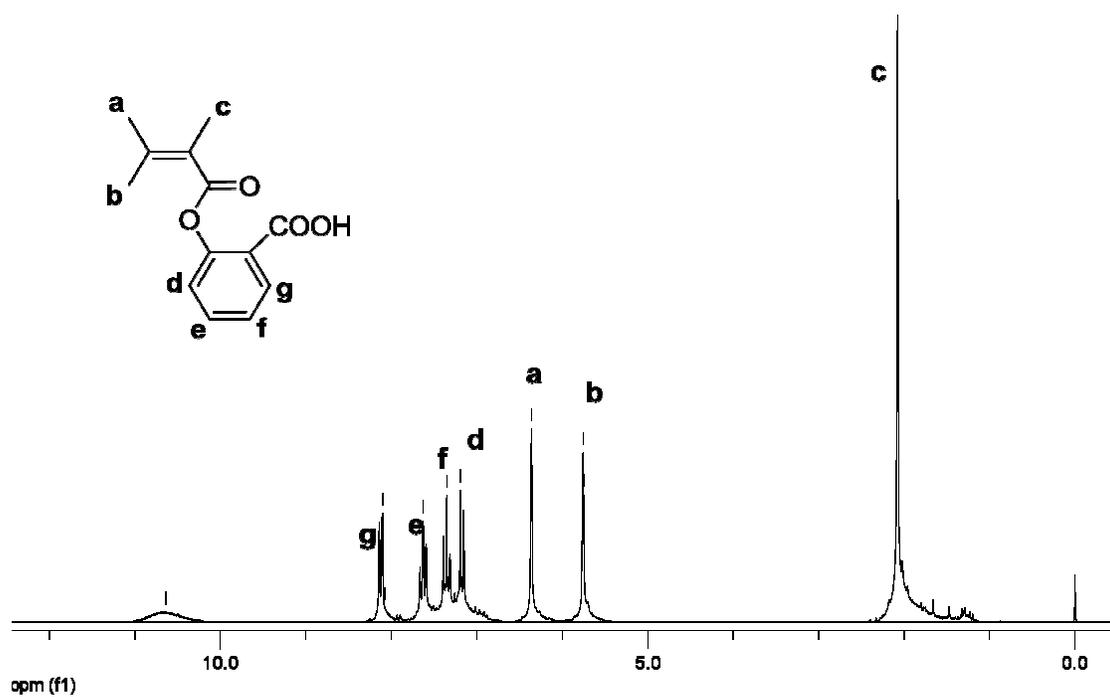
71. Missirlis, D., Kawamura, R. Tirelli, N.; Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *J.; Eur. J.Pharm. Sci.* **2006**,*29*,120-129.
72. Murthy, N., Xu, M. Schuck, S. Kunisawa, J. Shastri, N.; A new delivery vehicle for protein based vaccines: Acid degradable protein loaded microgels. . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**,*100*,4995-5000.
73. Chang, C., Wang, Z., Quan, Y., Cheng, H., Cheng, S.; Fabrication of a novel pH-sensitive glutaraldehyde cross-linked pectin nanogel for drug delivery *J. Biomater. Sci. Polym.* **2007**,*18*,1591-1599.
- 74.- Licea,A., Rogel, E., López, J., Castillo, L., Cornejo,J. Arndt, K.; A facile synthesis route for carboxyaryl-methacrylates: a way to obtain aromatic polyelectrolytes. *Designed monomers and polymers.* **2003**,*6*,67-80.
- 75.- Leobandung, W., Ichikawa, H., Fukumori,Y., Peppas, N.; Monodisperse nanoparticles of poly(ethylene glycol) macromers and *N*-Isopropyl acrylamide for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*; **2003**,*87*, 1678–1684.

ANEXOS

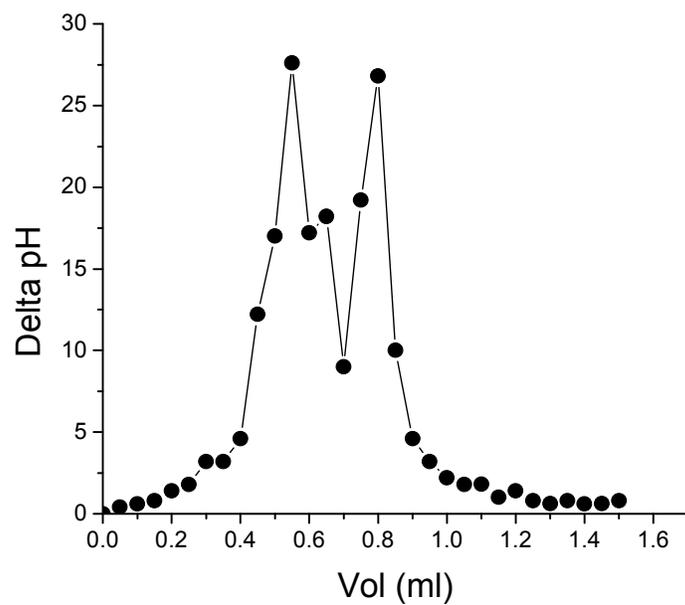
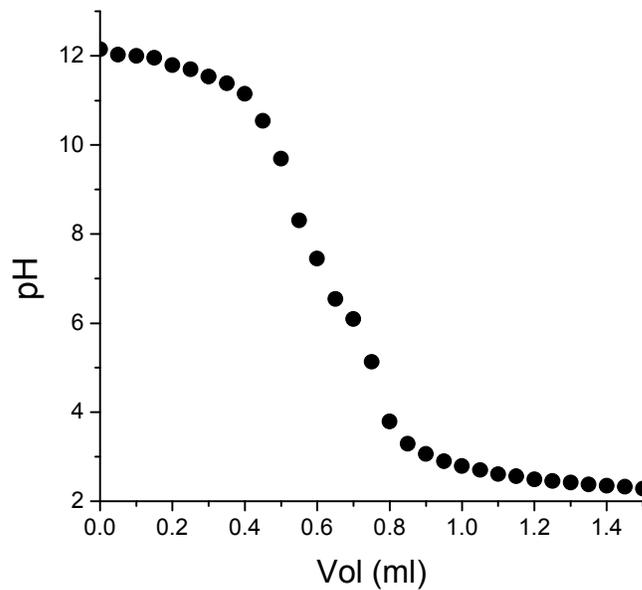
ANEXO 1. FTIR del Ácido Metacrililoiloxi-*o*-benzoíco (MAOB).



ANEXO 2. RMN H⁺ del Ácido Metacrililoiloxi-*o*-benzoíco (MAOB).



ANEXO 3. Curva de titulación de nanogeles, curva de la derivada del pH (NIPAAm/PEGMAM/EGDMA_{5%mol}/MAOB_{10%})



ANEXO 4. Cálculos para obtener el %w/w del ácido incorporado a los nanogeles.

$$\% \text{de ácido incorporado} = \frac{\text{peso del ácido}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

peso del ácido=

Vol. de titulante=

ANEXO 5. Cálculos para obtener el porcentaje de carga y la eficiencia.

Porcentaje de Carga

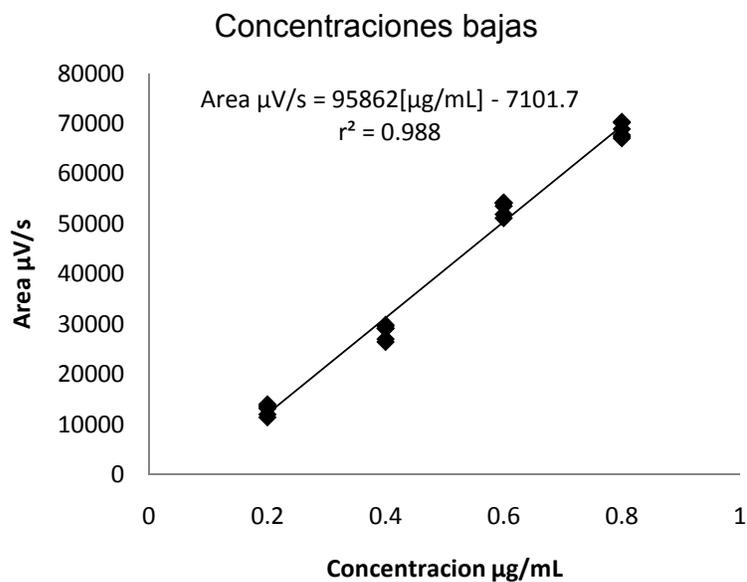
$$\% \text{ Carga} = \frac{w \text{ del fármaco}}{w \text{ de los nanogeles}} \times 100$$

Eficiencia

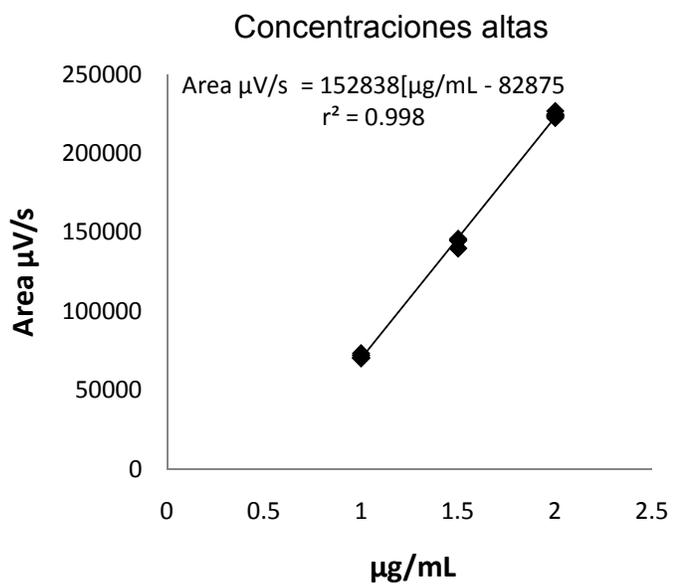
$$\text{Eficiencia} = \frac{w \text{ del fármaco recuperado}}{w \text{ del fármaco adicionado}} \times 100$$

ANEXO 6. Curva de calibración del 5-FU por HPLC

$\mu\text{g/mL}$	Abs
1	0.008
2	0.019
3	0.02
4	0.032
5	0.042
7	0.055
9	0.069
10	0.08
13	0.095
15	0.105

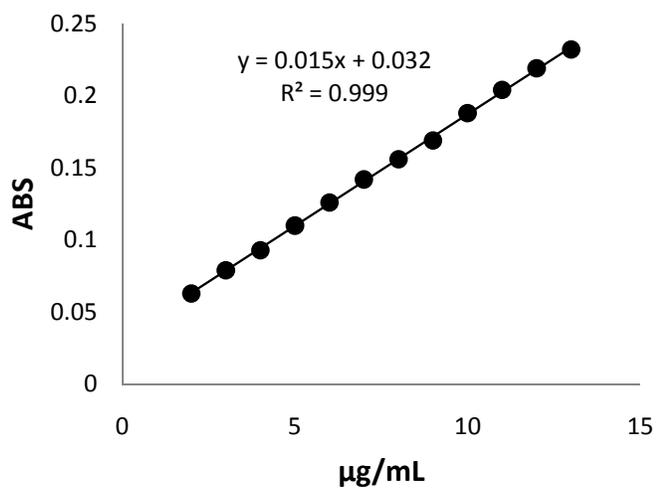


$\mu\text{g/mL}$	Abs
1	0.008
2	0.019
3	0.02
4	0.032
5	0.042
7	0.055
9	0.069
10	0.08
13	0.095
15	0.105



ANEXO 7. Curva de calibración para el cargado con DOX por espectrometría UV-VIS

µg/mL	Abs
2	0.063
3	0.079
4	0.093
5	0.11
6	0.126
7	0.142
8	0.156
9	0.169
10	0.188
11	0.204
12	0.219
13	0.232



ANEXO 8. Análisis para cuantificar la liberación de los nanogeles con 5-FU a diferentes condiciones.

Nanogeles EGDMA/MAOB a pH 7.4 37°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0			0	0	0	0	0
0.25	0.493	1.00	0.493	9.8478261	19.69565	984.78261	984.7826	0.3282609
0.5	0.588	1.00	0.588	11.913043	23.82609	1191.3043	1191.304	0.3971014
1	0.723	1.00	0.723	14.847826	29.69565	1484.7826	1484.783	0.4949275
4	0.897	1.00	0.897	18.630435	37.26087	1863.0435	1863.043	0.6210145
6	0.098	10.00	0.98	20.434783	40.86957	2043.4783	2043.478	0.6811594
12	0.096	10.00	0.96	20	40	2000	2000	0.6666667
24	0.092	10.00	0.92	19.130435	38.26087	1913.0435	1913.043	0.6376812

Nanogeles DVA/MAOB a pH 7.4 37°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0			0	0	0	0	0
0.25	0.833	1.00	0.833	17.23913	34.47826	1723.913	1723.913	0.4536613
0.5	0.09	10.00	0.9	18.695652	37.3913	1869.5652	1869.565	0.4919908
1	0.139	10.00	1.39	29.347826	58.69565	2934.7826	2934.783	0.7723112
4	0.141	10.00	1.41	29.782609	59.56522	2978.2609	2978.261	0.7837529
6	0.163	10.00	1.63	34.565217	69.13043	3456.5217	3456.522	0.909611
12	0.177	10.00	1.77	37.608696	75.21739	3760.8696	3760.87	0.9897025
24	0.165	10.00	1.65	35	70	3500	3500	0.9210526

Nanogeles EGDMA/MAOB a pH 5 y 42°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.58	1.00	0.58	11.7391	11.73913	1173.913	1173.913	0.301003
0.5	0.605	1.00	0.605	12.2826	12.28261	1228.261	1228.261	0.314939
1	0.972	1.00	0.972	20.2609	20.26087	2026.087	2026.087	0.519509
4	0.11	10.00	1.1	23.0435	23.04348	2304.348	2304.348	0.590858
6	0.12	10.00	1.2	25.2174	25.21739	2521.739	2521.739	0.6466
12	0.124	10.00	1.24	26.087	26.08696	2608.696	2608.696	0.668896
24	0.11	10.00	1.1	23.0435	23.04348	2304.348	2304.348	0.590858

Nanogeles DVA/MAOB a pH 5 y 42°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.232	1.00	0.232	4.17391	4.173913	417.3913	417.3913	0.099379
0.5	0.389	1.00	0.389	7.58696	7.586957	758.6957	758.6957	0.180642
1	0.922	1.00	0.922	19.1739	19.17391	1917.391	1917.391	0.456522
4	0.179	10.00	1.79	38.0435	38.04348	3804.348	3804.348	0.905797
6	0.188	10.00	1.88	40	40	4000	4000	0.952381
12	0.197	10.00	1.97	41.9565	41.95652	4195.652	4195.652	0.998965
24	0.185	10.00	1.85	39.3478	39.34783	3934.783	3934.783	0.936853

ANEXO 9. Análisis para cuantificar la liberación de la DOX.

Nanogeles EGDMA/MAOB pH 7.4 a 37°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.018	1.00	0.014	1.666667	3.333333	83.33333	83.33333	0.083333
0.5	0.014	1.00	0.018	2.333333	4.666667	116.6667	116.6667	0.116667
0.75	0.019	1.00	0.019	2.5	5	125	125	0.125
1	0.022	1.00	0.022	3	6	150	150	0.15
2	0.023	1.00	0.023	3.166667	6.333333	158.3333	158.3333	0.158333
4	0.024	1.00	0.024	3.333333	6.666667	166.6667	166.6667	0.166667
8	0.041	1.00	0.041	6.166667	12.33333	308.3333	308.3333	0.308333
12	0.044	1.00	0.044	6.666667	13.33333	333.3333	333.3333	0.333333
24	0.047	1.00	0.047	7.166667	14.33333	358.3333	358.3333	0.358333
48	0.044	1.00	0.044	6.666667	13.33333	333.3333	333.3333	0.333333

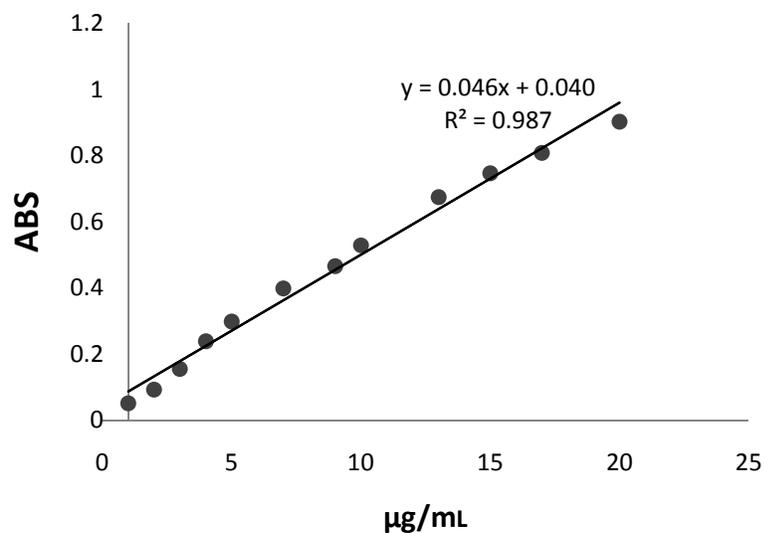
Nanogeles DVA/MAOB pH 7.4 a 37°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.009	1.00	0.009	0.833333	1.666667	41.66667	41.66667	0.041667
0.5	0.016	1.00	0.016	2	4	100	100	0.1
0.75	0.017	1.00	0.017	2.166667	4.333333	108.3333	108.3333	0.108333
1	0.019	1.00	0.019	2.5	5	125	125	0.125
2	0.027	1.00	0.027	3.833333	7.666667	191.6667	191.6667	0.191667
4	0.031	1.00	0.031	4.5	9	225	225	0.225
8	0.032	1.00	0.032	4.666667	9.333333	233.3333	233.3333	0.233333
12	0.038	1.00	0.038	5.666667	11.33333	283.3333	283.3333	0.283333
24	0.041	1.00	0.041	6.166667	12.33333	308.3333	308.3333	0.308333
48	0.035	1.00	0.035	5.166667	10.33333	258.3333	258.3333	0.258333

Nanogeles EGDMA/MAOB pH 5 a 42°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.007	1.00	0.014	1.666667	3.333333	83.33333	83.33333	0.083333
0.5	0.01	1.00	0.018	2.333333	4.666667	116.6667	116.6667	0.116667
0.75	0.018	1.00	0.018	2.333333	4.666667	116.6667	116.6667	0.116667
1	0.021	1.00	0.021	2.833333	5.666667	141.6667	141.6667	0.141667
2	0.029	1.00	0.029	4.166667	8.333333	208.3333	208.3333	0.208333
4	0.04	1.00	0.04	6	12	300	300	0.3
8	0.053	1.00	0.053	8.166667	16.33333	408.3333	408.3333	0.408333
12	0.067	1.00	0.067	10.5	21	525	525	0.525
24	0.081	1.00	0.081	12.83333	25.66667	641.6667	641.6667	0.641667
36	0.086	1.00	0.086	13.66667	27.33333	683.3333	683.3333	0.683333
48	0.095	1.00	0.095	15.16667	30.33333	758.3333	758.3333	0.758333
72	0.126	1.00	0.126	20.33333	40.66667	1016.667	1016.667	1.016667

Nanogeles DVA/MAOB pH 5 a 42°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.028	1.00	0.028	4	8	200	200	0.2
0.5	0.034	1.00	0.034	5	10	250	250	0.25
0.75	0.044	1.00	0.044	6.666667	13.33333	333.3333	333.3333	0.333333
1	0.056	1.00	0.056	8.666667	17.33333	433.3333	433.3333	0.433333
2	0.069	1.00	0.069	10.83333	21.66667	541.6667	541.6667	0.541667
4	0.086	1.00	0.086	13.66667	27.33333	683.3333	683.3333	0.683333
8	0.091	1.00	0.091	14.5	29	725	725	0.725
12	0.096	1.00	0.096	15.33333	30.66667	766.6667	766.6667	0.766667
24	0.104	1.00	0.104	16.66667	33.33333	833.3333	833.3333	0.833333
36	0.105	1.00	0.105	16.83333	33.66667	841.6667	841.6667	0.841667
48	0.1	1.00	0.1	16	32	800	800	0.8
72	0.06	1.00	0.06	9.333333	18.66667	466.6667	466.6667	0.466667

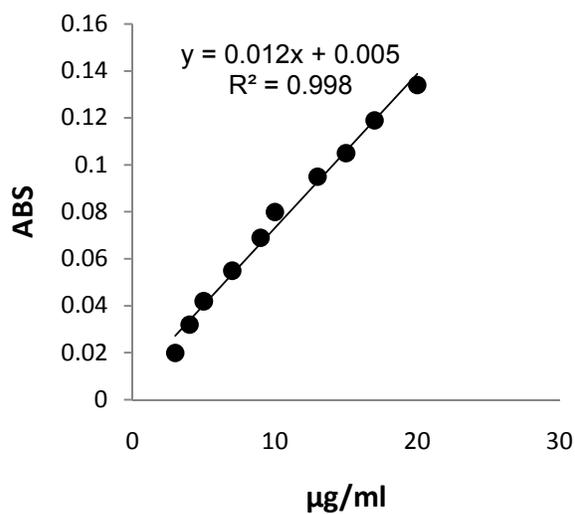
ANEXO 10. Curva de calibración para las liberaciones con 5-FU por espectrometría UV-VIS

$\mu\text{g/mL}$	Abs
1	0.051
2	0.092
3	0.155
4	0.239
5	0.298
7	0.399
9	0.466
10	0.529
13	0.675
15	0.747
17	0.809
20	0.903



ANEXO 11. Curva de calibración para las liberaciones con DOX por espectrometría UV-VIS

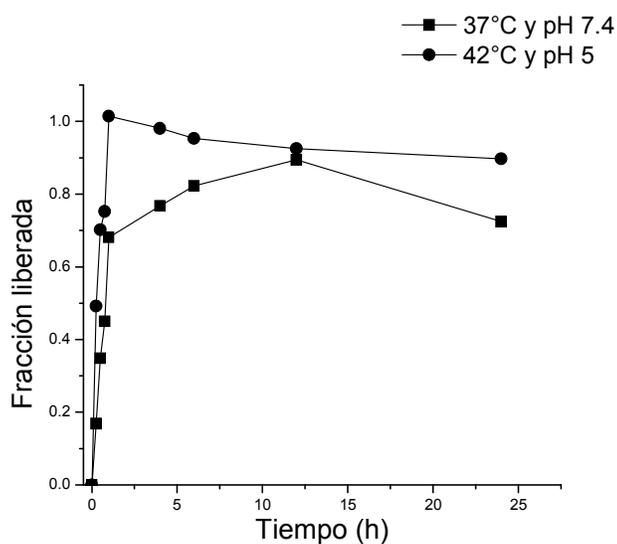
$\mu\text{g/mL}$	Abs
1	0.008
2	0.019
3	0.02
4	0.032
5	0.042
7	0.055
9	0.069
10	0.08
13	0.095
15	0.105
17	0.119
20	0.134
80	0.544
90	0.635
100	0.715



ANEXO 12. Análisis para cuantificar la liberación del blanco con 5-FU

Blanco a pH 7.4 y 37°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0.25	0.273	1.00	0.273	5.0652	10.1304	506.5217	506.522	0.16884
0.5	0.521	1.00	0.521	10.457	20.913	1045.652	1045.65	0.34855
0.75	0.661	1.00	0.661	13.5	27	1350	1350	0.45
1	0.098	10.00	0.98	20.435	40.8696	2043.478	2043.48	0.68116
4	0.11	10.00	1.1	23.043	46.087	2304.348	2304.35	0.76812
6	0.098	12.00	1.176	24.696	49.3913	2469.565	2469.57	0.82319
12	0.098	13.00	1.274	26.826	53.6522	2682.609	2682.61	0.8942
24	0.08	13.00	1.04	21.739	43.4783	2173.913	2173.91	0.72464

Blanco a pH 5 y 42°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.832	1.00	0.832	17.2174	17.21739	1721.739	1721.739	0.491925
0.5	0.13	10.00	1.3	27.3913	27.3913	2739.13	2739.13	0.702341
0.75	0.139	10.00	1.39	29.3478	29.34783	2934.783	2934.783	0.752508
1	0.186	10.00	1.86	39.5652	39.56522	3956.522	3956.522	1.014493
4	0.18	10.00	1.8	38.2609	38.26087	3826.087	3826.087	0.981048
6	0.175	10.00	1.75	37.1739	37.17391	3717.391	3717.391	0.953177
12	0.16	10.00	1.7	36.087	36.08696	3608.696	3608.696	0.925307
12	0.16	10.00	1.65	35	35	3500	3500	0.897436



ANEXO 13 Análisis para cuantificar la liberación del blanco con DOX.

Blanco pH 7.4 a 37°C								
Tiempo	Abs	Dil	ABS	Conc	Walicuota	Wmedio	Wlib	Flib
0	0		0	0	0	0	0	0
0.25	0.069	1.00	0.014	1.666667	3.333333	83.33333	83.33333	0.083333
0.5	0.104	1.00	0.018	2.333333	4.666667	233.3333	233.3333	0.074074
0.75	0.135	1.00	0.135	21.83333	43.66667	2183.333	2183.333	0.693122
1	0.145	1.00	0.145	23.5	47	2350	2350	0.746032
2	0.19	1.00	0.19	31	62	3100	3100	0.984127
4	0.21	1.00	0.21	34.33333	68.66667	3433.333	3433.333	1.089947
8	0.183	1.00	0.183	29.83333	59.66667	2983.333	2983.333	0.94709
12	0.15	1.00	0.15	24.33333	48.66667	2433.333	2433.333	0.772487
24	0.124	1.00	0.124	20	40	2000	2000	0.634921
48	0.115	1.00	0.115	18.5	37	1850	1850	0.587302

