

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

“Sistema de liberación transdermal, para administración tópica de 5-Fluorouracilo en melanoma”

TESIS

Presentado por

M.C.S. Hever Yuritzzy Vargas Molinero

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS E INGENIERIA

Director de tesis

Dra. Aracely Serrano Medina

Codirector

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

TIJUANA, B.C.; OTUBRE 17 DEL 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.366
Tijuana, B.C., a 22 de octubre, 2024

C. Hever Yuritzzy Vargas Molinero
Pasante de: Doctorado en Ciencias
Presente

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

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

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema "Sistema de liberación transdermal, para administración tópica de 5-
Fluorouracilo en melanoma".

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

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

M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
CAMPUS TIJUANA

Dra. Aracely Serrano Medina
Directora De Tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director De Tesis

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Albert mi esposo, mi compañero incansable en cada desafío que no han sido pocos. Agradezco profundamente tus sabios consejos sobre la importancia de valorar mi trabajo sin depender de validaciones externas. Tu ejemplo constante de dedicación y esfuerzo íntegro es una fuente inagotable de inspiración.

Esta tesis representa más que un logro académico; es una manifestación de nuestro lenguaje de amor, una conexión construida con cariño y comprensión. Tu presencia ha sido mi red de seguridad, brindándome confianza mientras avanzo en este proceso. Aprecio profundamente tu disposición a aprender conmigo y tus gestos interminables de cariño y apoyo

Este trabajo es un testimonio de nuestro viaje compartido y de las valiosas lecciones que hemos aprendido juntos. Aquí está, con gratitud y amor, dedicada a ti y a mi esfuerzo permanente por lograr nuestros sueños compartidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco mucho a la Dra. Aracely Serrano Medina, por sus enseñanzas, apoyo, consejos, profesionalismo, amistad, y confianza como su alumna. Así mismo, estoy muy agradecida con el Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Biofarmacia, por su confianza, sus clases y sus consejos para el desarrollo del proyecto.

Agradezco también al Dra. Kenia Palomino Vizcaino, por su apoyo, enseñanzas, y ser parte de mi comité. También, agradezco mucho al Dr Luis Jesús Villarreal Gómez, por su tiempo y disposición para instruirme en las técnicas electrohilado y abrirme las puertas de su laboratorio, por hacer más ameno el trabajo en su laboratorio y apoyarme durante todo el proyecto y crear un agradable ambiente de trabajo. Gracias al Dr. Eduardo Alberto Lopez Maldonado por ser mi sinodal y asesorarme y apoyarme durante el desarrollo del proyecto.

En especial quiero agradecer a Katy y Alondra, por su gran ayuda en todo momento para el desarrollo de este proyecto por su apoyo, amistad y complicidad. Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Biofarmacia, por haber trabajado en conjunto y convivido siempre con respeto. A Andrea Solorzano por ayudar y facilitar la burocracia correspondiente y traer tan bonita energía a posgrado. Agradezco profundamente al coordinador de posgrado, el Dr. Javier Emmanuel Castillo Quiñones, por su constante apoyo y profesionalismo. Durante la pandemia, cuando atravesé momentos difíciles al enfermarme de COVID, su comprensión y empatía fueron fundamentales para que pudiera seguir adelante. Su enfoque humano fue clave para mantenerme motivada y enfocado en mi trabajo académico.

Agradezco a mi familia, mi madre Yolanda Molinero, a mi padre Juan Vargas, por su apoyo incondicional en la realización de mis estudios. Y a mi hermano Hugo Vargas un pilar muy importante en la familia y una gran persona a la cual le quiero expresar mi profunda admiración y agradecer todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Me encuentro agradecida a esta ciudad Tijuana, Baja California, México, la cual me adoptó desde el comienzo de mis estudios profesionales, me convirtió en una orgullosa cimarrón, egresada de la Universidad Autónoma de Baja California, está mi alma mater a su vez me brindó la oportunidad y el apoyo para poder cursar mis estudios de posgrados. Agradeciendo a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, reconociendo a mi muy querido laboratorio de biofarmacia, donde se desarrolló el presente proyecto de investigación bajo la dirección de la **Dra. Aracely Serrano Medina** y el **Dr. José Manuel Cornejo Bravo**, en el programa de Doctorado en Ciencias e Ingeniería. Gracias al Centro de graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana por la colaboración del Dr. Ignacio Alfredo Rivero Espejel en la etapa de caracterización y por su disponibilidad y paciencia para compartir sus conocimientos.

Finalmente agradezco, a todo el personal académico y administrativo de la Universidad Autónoma de Baja California. Así mismo, se agradece el apoyo obtenido del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) para la realización de estudios de posgrado y el desarrollo de esta investigación a través de la beca CONAHCyT No. 765709.

INDICE

Contenido	Páginas
Hoja de aprobación	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Agradecimientos institucionales	V
Lista de abreviaturas	IX
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIV
Resumen	XV
Abstract	XII
CAPÍTULO I	19
INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedentes	20
1.2 Justificación	27
1.3 Objetivo general	30
1.4 Objetivos específicos	30
1.5 Hipótesis	31
CAPÍTULO II	32
TEORIA GENERAL	
2.1 Cáncer de piel tipo melanoma	33
2.2 Fármaco 5-fluorouracilo	36
2.3 Sistemas nanométricos para administración de fármacos en tejido canceroso	38
2.3.1 Nanoportadores catiónico	40
2.4 Síntesis de nanopartículas catiónicas por polimerización en emulsión	41
2.5 Técnica de Electrohilado	46
2.5.1 Electrohilado coaxial (co-electrohilado)	48
2.5.2 Nanofibras poliméricas	49

2.6 Incorporación de nanopartículas a nanofibras para el desarrollo de sistemas de suministro de fármacos y/o biomolécula	51
2.6.1 Incorporación de nanopartículas a nanofibras por adsorción	53
2.6.2 Incorporación de nanopartículas a nanofibras por encapsulación	53
2.6.3 Incorporación de nanopartículas a nanofibras por atrapamiento	54
2.7 Andamios de nanofibras como sistemas localizados de suministros de fármacos	56
2.8 Sistemas de liberación topico	57
CAPÍTULO III	62
EXPERIMENTAL	
3.1 Equipos y reactivos	63
3.2 Síntesis de nanogeles catiónicos de metacrilato de n,n-dietilaminoetilo (DEAEM)	66
3.2.1 Entrecruzadas con EGDMA	66
3.2.1 Entrecruzadas con DVA	68
3.2.3 Purificación de EGDMA	70
3.2.4 Purificación de nanopartículas	70
3.2.5 Liofilización y reconstitución de las nanopartículas	71
3.2.6 Cargado de nanogeles con 5-FU	72
3.2.6.1 Curva de calibración del 5-fu por UV-VIS	72
3. 3 Caracterización de nanogeles	74
3.3.1 Determinación del tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica	74
3.3.2 Determinación del potencial zeta por dispersión de luz dinámica	75
3.3.3 Preparación de la muestra para microscopía FE-SEM	75
3.4 Cinética de liberación de 5-FU a partir de los nanogeles cargados	76
3.4.1 Curva de calibración de la 5-FU por UV-VIS (pH 5 y 7.4)	76
3.4.2 Liberación del fármaco 5-fluorouracilo (5-FU)	78
3.5 Electrohilado e incorporación de nanogeles cargados con 5-FU a nanofibras poliméricas bioadhesivas (PVP)	79
3.5.1 Preparación de las soluciones poliméricas	79

3.5.2 Electrohilado	80
3.6 Caracterización de las nanofibras electrohiladas	81
3.6.1 Microscopía de barrido (SEM)	81
3.6.1.2 Diámetro promedio de las fibras	82
3.6.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	82
3.6.4 Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	83
3.7 Desarrollo de sistema bicapa biocompatible con la técnica de electrohilado.	83
3. 8 Capacidad bioadhesiva, ensayo de fuerza de adhesión	84
3.9 Permeación del 5-FU a partir del sistema de liberación	85
3.9.1 Estudios ex-vivo e in-vitro de permeación en celdas verticales de Franz de 5-fluorouracilo	86
3.9.2 Método de extracción de 5-fu de membrana ex-vivo (piel)	88
3.9.3 Método HPLC-UV para la cuantificación de 5-fluorouracilo después de un ensayo de permeación	89
3.10 Citotoxicidad celular	89
3.11 Sinergismo entre nanopartículas y fármaco	92
CAPÍTULO IV	93
RESULTADOS	
4. 1 Síntesis de nanogeles catiónicos de metacrilato de n,n-dietilaminoetilo (DEAEM)	94
4.1.2 Cargado de nanogeles catiónicos de metacrilato de n,n-dietilaminoetilo (DEAEM) con 5-fu	97
4.2 Caracterización de nanogeles	99
4.2.1 Efecto del pH en el diámetro hidrodinámico de los nanogeles	99
4.2.2 Efecto del pH en el potencial ζ de los nanogeles	101
4.2.3 Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	103
4.3 Cinética de liberación de 5-FU a partir de los nanogeles cargados	104
4.4 Electrohilado	106
4.4.1 Morfología nanofibras microscopia electrónica de barrido (SEM)	108

4.4.2 Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	110
4.4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	115
4.5 Capacidad bioadhesiva del sistema de liberación	118
4.6 Permeación del 5-FU a partir del sistema de liberación	118
4.7 Citotoxicidad celular y sinergismo	124
CAPITULO V	127
CONCLUSIONES	130
REFERENCIAS	130

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
5-FU_{h2}	5,6-dihidro-5-fluorouracilo
AIBA	2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propano]dihidrocloruro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BCC	Carcinoma de células basales
CMC	Concentración Micelar Crítica
D_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
DVA	3,9-Divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano
DEAEM	2-(dietilamino)etil metacrilato)

EGDMA	Dietilenglicol Dimetacrilato
EM	<i>Efecto matriz</i>
EPR	<i>Efecto permeación retención</i>
FESEM	Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
kV	Kilovoltio
μ	Micrómetro
mm	Milímetro
NG's	Nanogeles
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NMWC	Peso Molecular Promedio en Número
PCL	Policaprolactona
PDEAEM	Poli(2-(dietilamino)etil metacrilato)
PHK26	Marcado de Membrana Celular con Fluorescencia Roja
p/v	Relación Volumen de Polímero a Disolvente
PDI	Índice de Polidispersidad
PVP	Polivinilpirrolidona
SCC	Carcinoma de células escamosas
SC	Estrato corneo
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TDDS	Sistema de Suministro de Medicamentos Transdérmicos

TGA	Análisis Termogravimétrico
Tg	Temperatura de Transición Vítrea
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometría de ultravioleta-visible
V	Volumen
ζ	Potencial Z

LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO		Pag.
Figura 1	Representación de las capas del tejido cutáneo	21
Figura 2	Niveles de melanoma en las distintas capas de la piel	34
Figura 3	Estructura del 5-fluorouracilo	36
Figura 4	Representación de un nanogel en proceso de hinchamiento y liberación de fármaco.	39
Figura 5	Representación del EPR	40
Figura 6	Monómeros catiónicos, formas neutras de vinilpiridinas	43
Figura 7	AIBA, iniciador catiónico	44
Figura 8	Electrohilado	46
Figura 9	Estructura de 4 de los principales modelos de parches TDDS	59
Figura 10	Esquema general de metodología para la síntesis de nanogeles	66
Figura 11	Proceso de extracción de 5-FU de membrana biológica	88
Figura 12	Lector de placas Thermo Fisher Scientific-ES	91

Figura 13	Gráfica de distribución de tamaños de NG's entrecruzados con DVA antes de ser purificados, presentando buena calidad de lectura (A), gráfica de distribución de tamaños de NG's entrecruzados con DVA después de ser purificados, presentando error en la calidad de lectura (B)	95
Figura 14	Nanogeles en solución	96
Figura 15	Nanogeles en liofilizados	96
Figura 16	Gráfica de distribución de tamaños de NG's entrecruzados con EGDMA antes de ser purificados y después de ser liofilizados y reconstituidos.	97
Figura 17	Gráfica de distribución de tamaños de los NG's usados en el TDDS	99
Figura 18	Efecto del pH en el Dh	101
Figura 19	Efecto del pH en el potencial ζ	102
Figura 20	Microscopia FE-SEM de NG's de PDEAEM sin contraste (A), Microscopia FE-SEM de NG's de PDEAEM con contraste(B)	103
Figura 21	Cinética de liberación de las nanofibras a partir de los NG's	106
Figura 22	Microscopia SEM de andamio de nanofibras electrohiladas de PCL	108
Figura 23	Microscopia SEM de andamio de nanofibras electrohiladas de PVP (A) Microscopia SEM de andamio de nanofibras electrohiladas de PVP con NG's incorporados (B).	109
Figura 24	Microscopia SEM de uno de los bulbos del andamio de nanofibras electrohiladas de PVP con NG's incorporados	110
Figura 25	Espectro FT-IR y estructura de PVP	110
Figura 26	Espectro FT-IR y estructura de PCL	112
Figura 27	Espectro FT-IR y estructura de 5-FU	113
Figura 28	Comparación de los espectros que componen la capa de liberación de las nanofibras. Espectro FT-IR de DEAM,	114

	PVP, 5-FU y la combinación de los 3 en la capa de liberación	
Figura 29	Análisis termogravimétrico de PVP	115
Figura 30	Análisis termogravimétrico de PVP con nanogeles	116
Figura 31	Análisis termogravimétrico de PCL	117
Figura 32	Sistema de difusión por celdas de Franz	119
Figura 33	Membrana sintética (A), membrana biológica lado interno(B), membrana biológica lado externo (C)	119
Figura 34	Cromatograma HPLC del estándar de 5-FU a 20µg/mL en buffer pH 7.4	120
Figura 35	Comparación de los cromatogramas HPLC de las muestras obtenidas en el estudio permeación por difusión de 5-FU	121
Figura 36	Separación de fases de la extracción de 5-FU de la membrana biológica(A). Membrana biológica colocada en la celda de Franz al inicio del experimento(B). Membrana después de 24h al terminar la difusión (C)	122
Figura 37	Efecto matriz, misma concentración de analito en el estándar y en la muestra biológica, pero gran diferencia en el área de las bandas	123
Figura 38	Ensayo de citotoxicidad de los materiales estudiados. Los datos se presentan como media \pm SE; n =4. * P <0.05 ** P <0.01, *** P <0.001 frente al grupo tratado como control negativo (Viabilidad celular 100%), One Way ANOVA. Fisher's LSD post-hoc comparison	126

LISTA DE TABLAS

CONTENIDO		Pag.
Tabla 1	Porcentajes y pesos de reactivos para la síntesis de nanogeles con EGDMA	68
Tabla 2	Porcentajes y pesos de reactivos para la síntesis de nanogeles con DVA	70
Tabla 3	Volumen de alícuota en μg y concentración $\mu\text{g/mL}$ para curva de calibración del cargado de nanogeles con 5-FU	73
Tabla 4	Volumen de alícuota en μg y concentración $\mu\text{g/mL}$ para curva de calibración análisis de 5-FU	77
Tabla 5	Condiciones de electrohilado para cada solución polimérica	80
Tabla 6	Variables para la optimización del método de síntesis de nanogeles	94
Tabla 7	Cambio de tamaño de los NG's en diferentes pH	101
Tabla 8	Tamaño promedio del diámetro de las nanofibras	106
Tabla 9	Estructura y bandas identificadas en el espectro FT-IR de PVP	111
Tabla 10	Estructura y bandas identificadas en el espectro FT-IR de PCL	112
Tabla 11	Estructura y bandas identificadas en el espectro FT-IR de 5-FU	113
Tabla 12	Fuerza de adhesión en N de TDDS	118
Tabla 13 A	Datos de los estudios de citotoxicidad	125
Tabla 13 B	Datos de los estudios de citotoxicidad en %.	125

RESUMEN

El propósito fundamental de este estudio consiste en facilitar la administración del fármaco antimetabolito 5-FU en cáncer tipo melanoma, de una manera innovadora y novedosa desarrollando un sistema de liberación tópico (TDDS) utilizando la nanotecnología. Se busca abordar los inconvenientes asociados a los efectos secundarios derivados de la quimioterapia convencional y potenciar los efectos del fármaco, para esto se elaboró un parche transdérmico combinando la técnica de electrohilado y la síntesis de nanopartículas, obteniendo nanofibras con nanogeles catiónicos sensibles al pH. La estructura del parche se compone de una capa de liberación de nanofibras electrohiladas biodegradables y bioadhesiva de PVP donde se encapsularon nanogeles de PDEAM cargados con 5-FU y una capa protectora del biopolímero PCL.

Los nanogeles fueron sintetizados por el método de emulsión, las distribuciones de tamaño de partículas de los nanogeles se determinaron mediante dispersión luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Se obtuvieron nanopartículas con diámetros hidrodinámicos (D_h) promedio de 70 nm con una desviación estándar ± 17 y un PDI de 0.24. El D_h de los nanogeles fue analizado a distintos pH para poder observar su sensibilidad a los cambios del mismo resultando en un aumento a pH 1 por posible aglomeración y una disminución a pH 5 con D_h promedio de 62 nm, también se estudió la potencial zeta de los nanogeles a diferentes pH confirmando su naturaleza catiónica.

En el desarrollo de este TDDS, se aplicó una estrategia de encapsulación para incorporar eficientemente los nanogeles. La incorporación de nanogeles a la capa de liberación se

caracterizó por microscopia electrónica de barrido SEM y FT-IR, donde se demostró la incorporación de los nanogeles a las nanofibras de PVP. Se llevaron a cabo investigaciones sobre la bioadhesión del TDDS, revelando una capacidad bioadhesiva de 0.13 N como resultado.

Lo análisis de permeación de fármaco se llevaron a cabo utilizando celdas de Franz, donde se comprobó la permeación de los nanogeles a través de membras sintéticas demostrando la presencia de 5-FU al analizar la solución receptora por el método HPLC. Se utilizó un método novedoso para la extracción de 5-FU en las membranas biológicas, y se analizaras tanto las muestras de la extracción de la membrana como la solución receptora de los estudios de permeación ex vivo, pero debido al efecto matriz no se pudo observar la presencia del fármaco en los perfiles cromatográficos HPLC.

Se determinó la citotoxicidad y sinergismo del material utilizando experimentos *in vitro* con células de melanoma B16F10 (ATCC CRL-6475) por el método MTT y mediante el análisis estadístico de los resultados. Los datos se presentarán como media \pm SE; n =4. *P<0.05 **P<0.01, ***P<0.001 frente al grupo tratado con PVP/5-Fu (7 μ g/mL) como control positivo (Ctrl +), One Way ANOVA. Fisher's LSD post-hoc comparison.

ABSTRACT

The fundamental purpose of this study is to facilitate the administration of the antimetabolite drug 5-FU in the treatment of melanoma cancer by developing an innovative topical drug delivery system (TDDS) using nanotechnology. The aim is to address the drawbacks associated with conventional chemotherapy side effects and enhance the drug's effects. For this purpose, a topical patch was created by combining the electrospinning technique and nanoparticle synthesis, resulting in nanofibers with pH-sensitive cationic nanogels. The patch structure is comprised of two layers: a release layer of biodegradable and bioadhesive electrospun nanofibers of PVP, which encapsulate PDEAM nanogels loaded with 5-FU, and a protective layer of the biopolymer PCL.

Nanogels were synthesized by emulsion, and particle size distributions were determined through dynamic light scattering (DLS) and field emission scanning electron microscopy (FESEM). Particles had an average hydrodynamic diameter (D_h) of 70nm with a standard deviation of ± 17 and a PDI of 0.24. Analysis of nanogel D_h at different pH levels indicated an increase at pH 1, which was likely due to agglomeration. The analysis also indicated a decrease at pH 5 with an average D_h of 62nm. The zeta potential of the nanogels at various pH levels confirmed their cationic nature.

During the development of this TDDS, an encapsulation strategy was employed to efficiently incorporate the nanogels. Incorporation of nanogels into the release layer was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and FT-IR, demonstrating their integration into PVP nanofibers.

Bioadhesion studies of the TDDS were conducted, revealing the bioadhesive capacity of 0.13 N as a result. Drug permeation analyses were carried out using Franz cells, confirming nanogel permeation through synthetic membranes and the presence of 5-FU in the receptor solution by HPLC analysis.

A novel method was used for the extraction of 5-FU in biological membranes. Membrane extraction samples and ex vivo permeation studies' receptor solution were analyzed. However, due to the matrix effect, the presence of the drug in the HPLC chromatographic profiles could not be observed.

Cytotoxicity and synergism were confirmed with a cell culture medium using B16F10 melanoma cells (ATCC CRL-6475) through the MTT method, with statistical analysis. Data are presented as mean \pm SE; n = 4. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared to the PVP/5-Fu (7 μ g/mL) treated group as a positive control (Ctrl+), One Way ANOVA, Fisher's LSD post-hoc comparison.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, lo cubre por completo y, sirve como protección contra el calor, la luz, infecciones, etc., es decir cumple la función de ser la primera línea de defensa contra el ambiente (Gallo 2017; Lim 2021), siendo una barrera para la entrada de microorganismos potencialmente patógenos y contra sustancias químicas dañinas, otra de sus funciones es regular la temperatura del cuerpo, también almacena agua y grasa e impide que se pierda agua, además de ser el principal órgano encargado del sentido del tacto (Ishitsuka 2020).

En cuanto a sus características estas pueden variar mucho dependiendo de la parte del cuerpo, en cuanto a textura, color y grosos, aunque en promedio suele tener un grosor de 1.5mm y está estructurada en tres capas, y cada una de ellas tiene una función diferente (Rippa, Kalabusheva, and Vorotelyak 2019).

La epidermis, que a su vez consta del estrato córneo y la epidermis viable. El estrato córneo (SC) es la capa más externa de la piel. Es en gran parte responsable de la función de barrera de la piel y de la mala absorción de fármacos (Haydont, Bernard, and Fortunel 2019; Roger et al. 2019). Se compone de una matriz de 10-20 μm de espesor de corneocitos deshidratados y muertos. La epidermis viable (por lo general de aproximadamente 0,06 a 0,8 mm de grosor) se encuentra inmediatamente debajo del estrato corneo y representa la primera capa de células vivas. Consiste en aproximadamente 4 a 5 capas de fibroblastos dérmicos y queratinocitos. Debajo de la epidermis está la dermis, generalmente una capa de 0,3 a 5 mm de espesor que contiene tejido conectivo, glándulas sudoríparas, folículos pilosos y una red de capilares, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. La capa más profunda de la piel es el tejido

subcutáneo o hipodermis, que está compuesto de tejido conectivo fibroso, blanco y suelto en el que la grasa proporciona amortiguación (figura 1) (Knox and O'Boyle 2021).

Debido a que la incidencia de cáncer de piel en la población ha ido aumentando día a día. Por la exposición a los rayos UV que es la principal causa de este, ya que grandes cantidades de radiación UV traspasan la atmosfera terrestre debido al desgaste de la capa de ozono (Lindqvist, Epstein, and Landin-Olsson 2022).

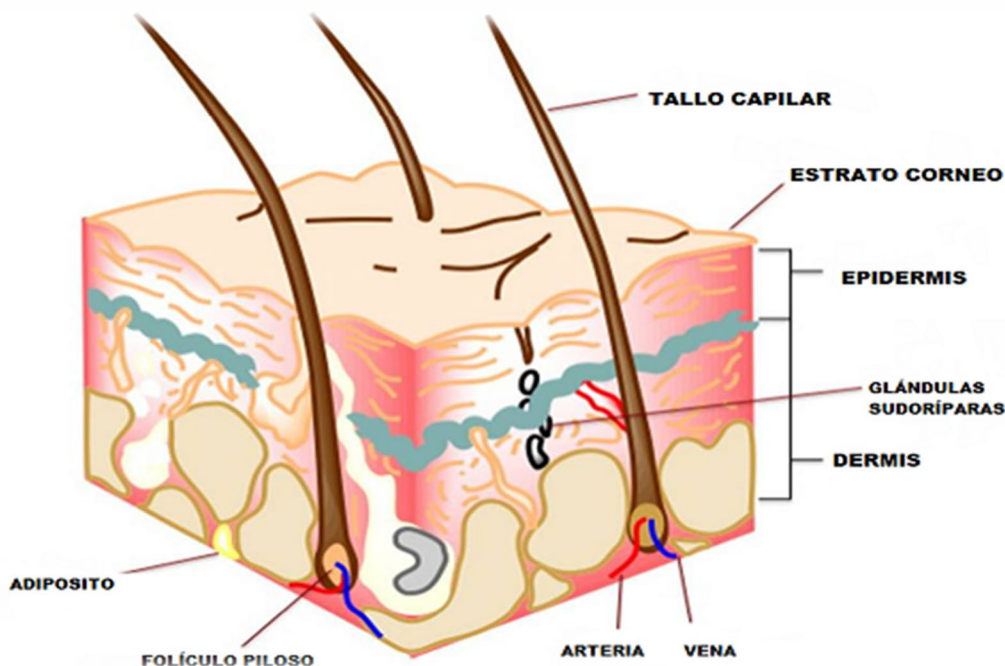


Figura 1. Representación de las capas del tejido cutáneo.

El cáncer de piel puede ser de dos tipos principalmente. 1. Melanoma maligno 2. Melanoma no maligno; que se divide en carcinoma de células basales (BCC) y carcinoma de células escamosas (SCC); BCC y SCC (Nicolás-Morala et al. 2022; Zambrano-Román et al. 2022).

El melanoma maligno puede deberse a una intensa exposición al sol y al historial de quemaduras solares. 80-85% de los cánceres de piel no melanoma son BCC y SCC. El más peligroso y responsable de un mayor número de muertes es el SCC (Sun et al. 2020). El cáncer de piel en una etapa temprana se puede curar fácilmente por procedimientos o técnicas simples, pero en una etapa avanzada no puede tratarse con ningún medicamento. Lo que hace de vital importancia una detección temprana. En total 80% de los cánceres de piel son BCC, el 16% son SCC y el 4% son melanoma. (Besson et al. 2021). El melanoma es el menos común que otros cánceres de piel. Sin embargo, es mucho más peligroso si no se detecta a tiempo. Causa la mayoría (75%) de las muertes relacionadas con el cáncer de piel. La prevención es el mejor método para el melanoma. Es el único cáncer prevenible que va en aumento (Mahamat-Saleh et al. 2019, 2023).

Ningún tipo de tratamiento es ideal para todas las lesiones. Los objetivos del tratamiento son la eliminación total del tumor, preservación de la función y una buena cosmética. Nuevos enfoques terapéuticos moleculares para el cáncer de piel incluyen varios medicamentos como criocirugía e inmunomodulación con imiquimod, 5-Fluoropirimidina-2,4-diona (5-FU), terapia fotodinámica y radiación (Peris et al. 2019).

El 5-FU fue diseñado, sintetizado y patentado por Charles Heidelberger en 1957. Descubrió que inhibía marcadamente los tumores en ratones. El 5-FU puede atravesar la barrera hematoencefálica y ser potencialmente mortal para individuos sensibles (Muggia, Peters, and Landolph 2009).

Se ha demostrado que el 5-fluorouracilo tópico (Efudex) es de gran valor en el tratamiento de cánceres de piel, úlceras de Marjolin y carcinoma avanzado de células escamosas de

la boca y el esófago. Se ha recomendado su uso en pacientes con displasia melanocítica y melanoma lentigo maligno. Este informe confirma el uso de 5-FU tópico para el melanoma lentigo maligno y la displasia melanocítica. En los melanomas con mal pronóstico, el tratamiento preoperatorio con 5-FU tópico convierte el infiltrado celular de células inflamatorias agudas en células redondas que se ha demostrado que son células T (Vodenkova et al. 2020). Creemos que esta estimulación preoperatoria de la propia reacción inmune de los pacientes frente al tumor puede ser de gran importancia para mejorar los resultados quirúrgicos de los melanomas de mal pronóstico (Reyes et al. 2020).

Para superar el problema de la administración de 5-FU se aprovecha el uso de materiales nanométricos con los cuales puede ser desarrollado un sistema de liberación tópico (TDDS) donde una vez que se aplica un producto TDDS, los ingredientes farmacéuticos activos penetran en la piel. Luego atraviesan el estrato córneo, penetran en la epidermis, en la dermis y finalmente se absorben en los vasos capilares periféricos para ser distribuidos por el resto del cuerpo (He et al. 2023).

Las nanopartículas se han investigado para diversas aplicaciones biomédicas durante más de una década. En general, el uso de nanopartículas ofrece varias ventajas sobre otros sistemas de administración de fármacos. Las nanopartículas más comúnmente utilizadas para la administración tópica y / o transdérmica de fármacos son las nanopartículas poliméricas, nano emulsiones, nanopartículas a base de lípidos (liposomas y nanopartículas de lípidos sólidos), nanopartículas metálicas y dendrímeros (Ewert de Oliveira et al. 2021).

El tamaño de las nanopartículas juega un papel importante en el tratamiento terapéutico, es uno de los factores para decidir la velocidad del portador del fármaco, la especificidad hacia la unión o la adhesión y la reactividad. Así, la tecnología de nanopartículas abre un nuevo dominio para las aplicaciones de administración de fármacos y el uso terapéutico (Choukaife, Doolaanea, and Alfatama 2020).

El monómero para desarrollar los nanogeles se elige aprovechando su sensibilidad a los cambios de pH. Su comportamiento se basa en el colapso o en el hinchamiento del gel cuando ocurren cambios en el pH del medio. A través del diseño racional, los sistemas de administración de medicamentos a nano escala se pueden desarrollar combinando propiedades deseables, tanto sintéticos como biológicos, para diversas aplicaciones incluyendo transdérmicos e implantables (de Guzman et al. 2011; Langer and Folkman 1976; Villarreal-Gómez et al. 2018).

Entre los diferentes nanomateriales se encuentran las nano fibras, que dotan de una gran superficie para especificar la zona a tratar, una estructura porosa, así como gran compatibilidad con el tejido cutáneo. El electrohilado es un proceso relativamente simple, fácil de usar y económico que se utiliza para fabricar nanofibras (Gruppuso et al. 2021; Ismail, Ali-Adib, and Younes 2019; Rahma et al. 2016).

Los tapetes de fibra se pueden aplicar directamente sobre una herida como apósitos liberadores de fármacos debido a su propiedad de manipulación maleable. Las esteras de fibra pueden cubrirse con otros vendajes no adherentes usados clínicamente para mantener un ambiente húmedo de la herida (Khan et al. 2021; A. Mohamed and Xing 2012).

Se ha propuesto que los nanogeles catiónicos pueden interactuar con la membrana celular, desencadenando la interrupción de esta y provocando un flujo de Ca^{2+} intracelular. Este aumento en los niveles de Ca^{2+} induce la desgranulación y el estrés oxidativo en las células. Como consecuencia de estos efectos, se produce citotoxicidad y finalmente, la muerte celular (Hwang et al. 2015; Maher et al. 2018). Por tanto, se puede concluir que un nanogel catiónico tiene la capacidad de penetrar las células. La continua protonación de estos nanogeles provoca una afluencia de electrolitos, lo que conduce a la hinchazón osmótica y la ruptura lisosomal. Este proceso culmina en la rápida liberación del fármaco en el citoplasma. Esta teoría fue confirmada por Xu et al. en su estudio utilizando poli(N,N-diethylaminoetimetato metacrilato) (PDEAEM) bloques de copolímeros con micelas formadoras de PEG, que estaban cargados con tinte fluorescente rojo PHK26 (Xu et al. 2006).

Por otro lado, Lizbeth A. Manzanares-Guevara y su equipo diseñaron nanogeles que se acumulan en el sitio del tumor mediante el Efecto EPR (con un diámetro hidrodinámico <175 nm y una capa de PEG). Estos nanogeles tienen la capacidad de cargarse parcialmente y expandirse en entornos tumorales ligeramente ácidos (con un pH de 6.0-6.8). Esta característica les permite penetrar en las células cancerosas, especialmente debido a su naturaleza catiónica basada en PDEAEM. Además, estos nanogeles pueden entregar eficientemente la molécula de carga en las endosomas/lisosomas (con un pH de 6 a 5). Los estudios llevados a cabo confirmaron que los nanogeles, cuando contienen la cantidad adecuada de PDEAEM (20% en peso o menos), pueden utilizarse como un vector eficiente para la entrega controlada y sensible al pH del fármaco no específico 5-FU. Este enfoque está especialmente dirigido a las células de cáncer colorrectal,

induciendo la apoptosis como mecanismo de muerte celular (Manzanares-Guevara et al. 2018, 2020).

Estudios recientes han subrayado el potencial del andamio de nanofibras electrohiladas como una técnica sumamente prometedora en la administración simultánea de diversos fármacos. Esta metodología destaca por su capacidad para cargar múltiples sustancias, su facilidad de operación y su costo relativamente bajo. Los diseños para sistemas de administración varían según el tipo de fármaco a ser administrado, permitiendo una adaptabilidad crucial en el campo de la terapia médica (Mohamady Hussein et al. 2021). Un ejemplo relevante de esta tecnología se encuentra en el trabajo de Damanpreet Kaur y su equipo, quienes desarrollaron un parche transdérmico a partir de nanofibras compuestas de alcohol polivinílico biodegradable (PVA) y polivinilpirrolidona (PVP). Este parche, cargado activamente con un fármaco antiemético, mostró un patrón de liberación controlada de la droga. La tasa de liberación variaba según la concentración de PVP en el parche, lo que sugiere la versatilidad de este enfoque en la administración precisa de medicamentos (Kaur et al. 2015).

Además, se han reportado avances significativos en el tratamiento del cáncer de páncreas mediante parches farmacológicos. Por ejemplo, Eunsung Jun y su equipo construyeron parches cargados con 5-FU utilizando la técnica de electrospinning, que utiliza fuerza electrostática para generar nanofibras. Estos parches demostraron su eficacia tanto in vitro como in vivo, utilizando líneas celulares de cáncer de páncreas. Los resultados, confirmados mediante técnicas de bioimagen, mostraron la inhibición del crecimiento tumoral en modelos subcutáneos. La inserción del parche 5-FU en ratones,

seguida de la inoculación de células cancerosas, resultó en una significativa reducción del tamaño del tumor durante un período de 25 días (Jun et al. 2017).

En resumen, estos avances destacan el potencial de los nanogeles y los parches de nanofibras en la administración controlada de fármacos, especialmente en el tratamiento específico de enfermedades como el cáncer de páncreas. Estas innovadoras tecnologías no solo ofrecen una liberación precisa de medicamentos, sino que también abren nuevas posibilidades para mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios en los pacientes.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El melanoma es un problema de salud pública importante que impone una carga financiera y de salud pública sustancial. Las tasas de incidencia de melanoma continúan aumentando aproximadamente un 3% anual. La lucha contra el melanoma por vía tópica es una tarea muy desafiante debido a la baja selectividad, la escasa eficacia y el entorpecimiento del entorno biológico de la piel.

La necesidad de una terapéutica segura y eficaz en el tratamiento del cáncer de piel tipo melanoma nos sitúa en la búsqueda de tratamientos en los cuales se aproveche la utilidad y precisión de los fármacos anticancerosos, que garantice una mayor seguridad después de administrados, así como especificidad en el tejido dañado, para disminuir o anular el potencial de lesión a tejidos sanos. Se ha demostrado que el 5-FU es eficaz incluso en dosis de fármaco muy bajas (0,2% p / v) contra el melanoma.

Desafortunadamente, la quimioterapia con 5-FU tiene varias limitaciones, incluida su vida media corta, alta citotoxicidad y baja biodisponibilidad. Para superar los inconvenientes

del 5-FU y mejorar su eficacia terapéutica en el entorno de la salud, uno de los principales tratamientos para el cáncer es la quimioterapia, la cual tiene grandes limitaciones y genera varios efectos adversos, por ejemplo, cardiotoxicidad; este efecto puede manifestarse de diversas maneras que van desde una elevación transitoria de la tensión arterial, bradicardia, hipotensión o arritmias, hasta una insuficiencia cardíaca no reversible. Otro ejemplo es el efecto genotóxico de los fármacos antineoplásicos en las células no tumorales, teniendo especial significancia debido a la posibilidad de que puedan inducir alteraciones genéticas en las células y tumores secundarios en pacientes con cáncer.

Los fármacos antineoplásicos pueden interactuar con el ADN, directa o indirectamente, dañando e inhibiendo la síntesis de ADN, afectando la mitosis e inhibiendo la proliferación celular.

El uso de la nanotecnología puede crear nuevos tratamientos alternativos, que pueden ser más eficientes, minimizando los efectos secundarios y reduciendo significativamente el costo del tratamiento tanto para el gobierno como para los pacientes.

Las nanopartículas representan una alternativa, ya que, como vehículos acarreadores de fármacos antineoplásicos, tienden a acumularse en el tejido tumoral por el EPR, minimizando la distribución sistémica. Esto es de suma importancia, ya que administraciones parenterales de potentes anticancerígenos frecuentemente induce efectos secundarios intensos debidos a la acción de los fármacos en sitios no deseados. Con esta acción inespecífica del fármaco, la concentración de fármaco ubicada en el tumor no es la óptima, ya que gran parte del fármaco disponible se distribuye de manera

general en el organismo, entrando también en tejido sano lo que conduce a la toxicidad y finalmente la dosis efectiva se convierte en una dosis ineficaz.

Es por este motivo que es necesario prevenir estos efectos indeseados a través de la creación de nuevas moléculas acarreadoras de fármacos antineoplásicos con acciones similares, que dirijan y coloquen el fármaco específicamente en el tumor, minimizando el depósito en las células sanas.

Las nanofibras son ideales para este propósito porque sus dimensiones son similares a los componentes de la matriz extracelular nativa e imitan su estructura fibrilar, proporcionando señales esenciales para la organización celular y la función de supervivencia.

El pH de la piel favorece la penetración de nanopartículas y, mediante una solución de pH más bajo, es posible lograr una fuerza electrostática disminuida

Las nanofibras poliméricas electrohiladas han demostrado ser una estrategia interesante para la aplicación de sistemas de administración de fármacos. La alta relación superficie-volumen de las fibras puede mejorar algunos procesos, como la unión y proliferación celular, la carga de fármacos y los procesos de transferencia de masa.

La ventaja de este método es que se puede cargar una amplia variedad de fármacos de baja solubilidad en las fibras para mejorar su biodisponibilidad o para lograr una liberación controlada.

En este proyecto se pretende multiplicar las ventajas tanto de nanofibras y nanogeles en una membrana tipo parche donde los nanogeles son útiles para proporcionar portadores funcionales de suministro para la vasculatura tumoral. Por lo tanto, estas partículas pueden unir el polímero a la membrana celular maligna, a los sitios receptores nucleares

o citoplasmáticos, lo que permite reducir la toxicidad en el tejido normal, una vez que es posible aumentar la concentración del fármaco en las células diana y distribuirlos a los pacientes de una forma menos invasiva

1.3 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de liberación topico de nanogeles, cargados con fármaco anticancerígeno 5-FU para el tratamiento del cáncer tipo melanoma.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanogeles catiónicos de metacrilato de n,n-dietilaminoetilo (DEAEM), por el método de dispersión por emulsión para agregarlos al sistema bicapa.
- Cargar los nanogeles con un fármaco antineoplásico elegido para usar en farmacoterapia contra el melanoma (5-FU), por el método de equilibrio-diálisis.
- Caracterizar los nanogeles sintetizados, mediante FESEM para observar su morfología y DLS para medir diámetro hidrodinámico y potencial zeta.
- Estudiar la cinética de liberación del fármaco a partir de los nanogeles cargados, en condiciones de un microambiente sano y microambiente tumoral. Para determinar su conducta con las diferentes temperatura y pH.
- Electro hilar nanofibras bioadhesiva de PVP en la que se incorporen los nanogeles cargados de 5-FU
- Caracterizar las nanofibras electrohiladas con, TGA, y SEM
- Desarrollar un sistema bicapa biocompatible con la técnica de electrohilado. Una capa (backing) de respaldo y protección del fármaco contra el medio y una capa adhesiva que contenga los nanogeles cargados.

- Estudiar la capacidad bioadhesiva, con el ensayo de adhesión.
- Determinar la permeación del 5-FU a partir del sistema topico utilizando piel humana, utilizando las celdas de Franz y analizando el fármaco contenido en donador (piel) y receptor (buffer) dependiendo de las condiciones de un microambiente sano y microambiente tumoral. Para analizar con HPLC utilizando el método UV.
- Probar la efectividad citotóxica del sistema en un cultivo celular;
- Estudiar sinergismo entre las nanopartículas y el fármaco para garantizar la ventaja de los nanogeles catiónicos.

1.5 HIPÓTESIS

Será posible desarrollar un sistema de liberación topico de nanogeles, cargados con fármaco anticancerígeno 5-FU para el tratamiento del cáncer tipo melanoma donde se mejore la permeación de este y pueda penetrar en el estrato corneo depositando los nanogeles en las células enfermas, aprovechando la micro atmósfera acida para que se libere específicamente en el tumor y optimizando el efecto terapéutico producto del sinergismo entre la citotoxicidad del nanogel y el 5-FU.

CAPÍTULO II
TEORIA GENERAL

2.1 CANCER DE PIEL TIPO MELANOMA

El melanoma, reconocido como una entidad nosológica distinta, fue descrito por primera vez en Europa en 1804 y en América del Norte en 1837. En los primeros años del siglo XX, era un cáncer poco común, pero en la década de 1930, hubo un aumento notable en la incidencia del cáncer de piel, acompañado por un aumento espectacular en las muertes relacionadas entre 1950 y 1980. Este cambio coincidió con la promoción de la exposición al sol, incluyendo el aumento en el uso de helioterapia para tratar enfermedades y un cambio en la actitud del público hacia el bronceado, debido a los cambios culturales en los ideales de belleza (Saginala et al. 2021).

Desde el punto de vista de la biología epidérmica, los melanocitos normales se encuentran en la capa basal de la epidermis y producen un pigmento llamado melanina. Estos melanocitos protegen a los queratinocitos mitóticamente activos contra el daño del ADN inducido por la luz ultravioleta. Además, los melanocitos pueden encontrarse en la dermis y otros tejidos extracutáneos, como la úvea y varios órganos atípicos, lo que puede ser relevante para la formación de melanoma en sitios menos típicos (Raimondi, Suppa, and Gandini 2020).

El melanoma es un tumor maligno derivado de la transformación maligna de los melanocitos, que se originan en la cresta neural y migran a la epidermis. Puede surgir esporádicamente o a partir de una lesión premaligna preexistente. Debido a que los melanocitos tienen su origen en la cresta neural, los melanomas pueden surgir en otros lugares donde se encuentran células de la cresta neural, incluyendo el cerebro y el tracto gastrointestinal. Alrededor del 10% al 25% de los melanomas se localizan en la región

de la cabeza y el cuello, siendo los sitios más comunes el cuero cabelludo occipital y la piel de la mejilla (Dvořánková et al. 2017; Trager et al. 2020). Además, el melanoma es el quinto cáncer más común. La incidencia del melanoma maligno está en aumento a nivel mundial. Aunque los tumores en etapas iniciales pueden tratarse fácilmente con cirugía, las opciones terapéuticas para etapas avanzadas son limitadas y las células de melanoma se propagan rápidamente por el cuerpo (figura 2), formando múltiples metástasis, lo que resulta en una baja tasa de supervivencia. Por lo tanto, la investigación del melanoma se enfoca en el diagnóstico temprano y el desarrollo de opciones terapéuticas novedosas y más efectivas (Antiqueira-santos et al. 2021; Pourmanouchehri et al. 2022).

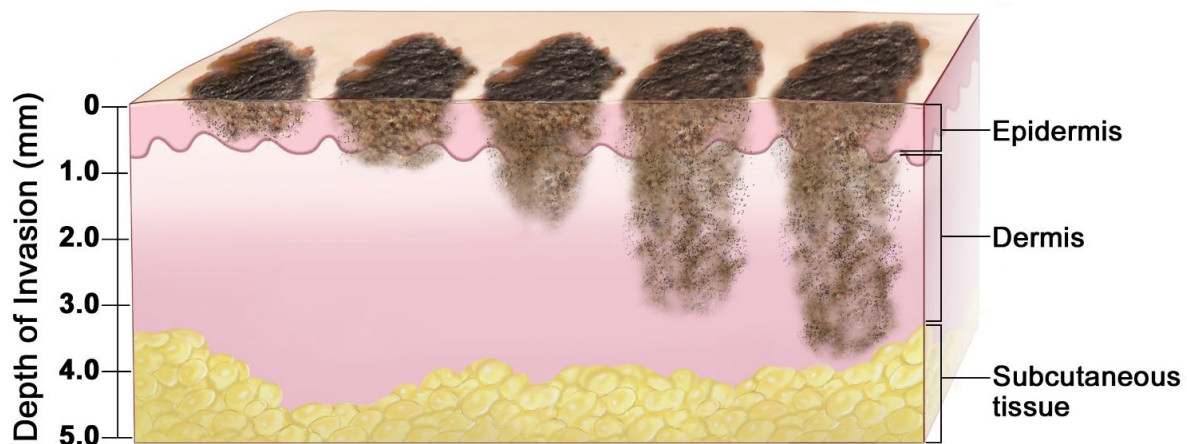


Figura 2. Etapas de melanoma en las distintas capas de la piel.

El retraso en el tratamiento puede provocar desfiguración estética, pérdida funcional y un impacto negativo en la calidad de vida, e incluso puede ser fatal. Por lo tanto, es crucial buscar tratamientos más efectivos que prevengan o reduzcan la proliferación del melanoma, dada su naturaleza extremadamente agresiva (Jiannong Li et al. 2022; Nassar and Tan 2020). Actualmente, la prevención y la detección temprana son los

métodos más exitosos en la lucha contra este tipo de cáncer, ya que los tratamientos quimioterapéuticos existentes no son muy eficaces. Por lo tanto, es de suma importancia identificar compuestos y tratamientos más eficaces que detengan o reduzcan la proliferación del melanoma, incluso en sus etapas avanzadas (J. Zhang et al. 2023).

Las muestras de piel representan un desafío bioanalítico significativo debido a la complejidad de esta matriz. Los estudios han demostrado que la quimioterapia convencional contra el melanoma no ofrece resultados prometedores, ya que las inyecciones intertumORAles o intravenosas no administran agentes terapéuticos de manera específica y eficiente, y además pueden causar toxicidad sistémica.

La ubicación del melanoma entre la dermis y la epidermis ha llevado al desarrollo de sistemas locales de administración de fármacos, que ofrecen una forma efectiva de administrar terapias al sitio específico del tumor. En la búsqueda de tratamientos más efectivos, es crucial encontrar soluciones que prevengan o reduzcan la proliferación del melanoma, dada su naturaleza altamente agresiva (Alli et al. 2023; Hu et al. 2023; Rantala et al. 2022).

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco antimetabolito ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer de piel. Aunque es eficaz contra las neoplasias malignas, su administración sistémica se limita debido a sus graves efectos secundarios. Para abordar este problema, se ha propuesto la administración tópica de 5-FU como una alternativa; sin embargo, la escasa permeabilidad del 5-FU a través de la piel sigue siendo un desafío (Elder et al. 2020; Tímár and Ladányi 2022).

2.2 FÁRMACO 5-FLUOROURACILO

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un compuesto que fue desarrollado en 1957 como un posible tratamiento contra el cáncer. Es un análogo fluorado del uracilo y actúa como un análogo de pirimidina. Fue uno de los primeros antimetabolitos sintéticos utilizados en la práctica clínica y sigue siendo ampliamente utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, cabeza, cuello y tracto digestivo, como el cáncer colorrectal (Boland and Hochster 2021).

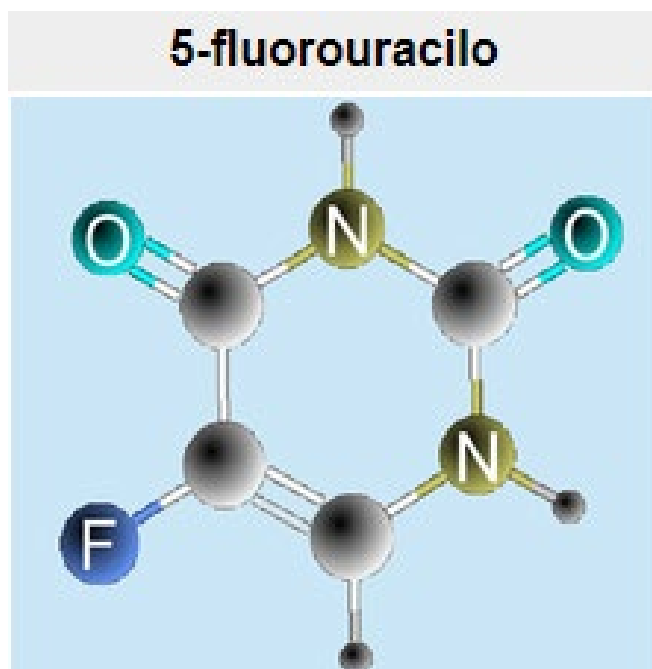


Figura 3. Estructura del 5-fluorouracilo.

Cuando se administra, el 5-FU se transforma en las células en monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, que inhibe la timidilato sintasa. Esto reduce la formación de precursores de timidina necesarios para la síntesis de ADN, bloqueando así la formación de timidina esencial para la síntesis de ADN y llevando a la "muerte celular sin timina" (Bálintová, Matúšková, and Gábelová 2022).

A pesar de su eficacia, el 5-FU presenta desafíos en su uso. Las muestras de piel son particularmente difíciles de analizar debido a la complejidad de esta matriz. Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al 5-FU

como un carcinógeno de tercer nivel con un umbral de toxicidad de 230 ng L⁻¹ (L. Chen et al. 2022; M. B. Mohamed et al. 2012; Urick et al. 2011).

El cuerpo no puede absorber completamente el 5-FU después de la ingestión; una parte significativa se convierte en un metabolito inactivo llamado 5,6-dihidro-5-fluorouracilo (5-FUH₂) mediante una reacción catalizada por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD). Alrededor del 80% se transforma en metabolitos mediante enzimas y el 10-20% restante se excreta intacto del cuerpo (Wigmore et al. 2010).

El 5-FU tiene una alta polaridad y se utiliza en diversas terapias, incluyendo el tratamiento tópico de enfermedades de la piel como el cáncer de piel, vitíligo y psoriasis. Aunque tiene una corta vida media en suero (10-25 minutos), la actividad de la timidilato sintasa puede tardar más de 24 horas en volver a la normalidad después de una única inyección de 5-FU. Los pacientes con deficiencia de DPD pueden experimentar toxicidad aguda con su administración, y los efectos secundarios incluyen vómitos y diarrea, que se han relacionado con desequilibrios en el microbioma intestinal (Aliabadi et al. 2022).

El 5-FU puede cruzar la barrera hematoencefálica rápidamente y ha sido asociado con síntomas neurológicos temporales como encefalopatía y síndrome cerebeloso. Sin embargo, también se han informado síntomas más persistentes, como deterioro cognitivo, confusión y problemas de memoria, que afectan significativamente la calidad de vida y la capacidad para volver al trabajo. Además, la aplicación tópica de 5-FU contra el cáncer ha sido restringida debido a su eficacia parcial, inflamación, ardor y toxicidad dermatológica, lo que lleva a un período de tratamiento prolongado (Boland and Hochster 2021; X. Li et al. 2022).

2.3 SISTEMAS NANOMÉTRICOS PARA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS EN TEJIDO CANCEROSO

En la actualidad, dentro del ámbito de las terapias contra el cáncer, es esencial la idea de que un vehículo de administración se dirija de manera específica hacia el objetivo deseado, ya sea de forma pasiva o activa. Esto es fundamental para asegurar que las dosis efectivas del fármaco lleguen a la región patológica de interés sin dañar las células o tejidos sanos circundantes. Una estrategia prometedora en este sentido implica el desarrollo de plataformas de administración nanométricas capaces de dirigirse específicamente al tejido tumoral, evitando la fragmentación y degradación prematuras del fármaco y facilitando la transferencia de una carga concentrada a través de la membrana celular (Peng et al. 2022). Este enfoque integral podría permitir una entrega controlada mediante la activación a través de estímulos como temperatura, pH o luz, entre otros (Bañobre-López, Teijeiro, and Rivas 2013; Santos et al. 2013).

Es crucial tener en cuenta que, para liberar cargas concentradas de fármaco en tejidos enfermos, se requiere una plataforma de entrega robusta que pueda controlar la liberación precisa del fármaco mediante una activación previa por un estímulo externo (figura 4) (Gorain et al. 2022; Seigneuric et al. 2010).

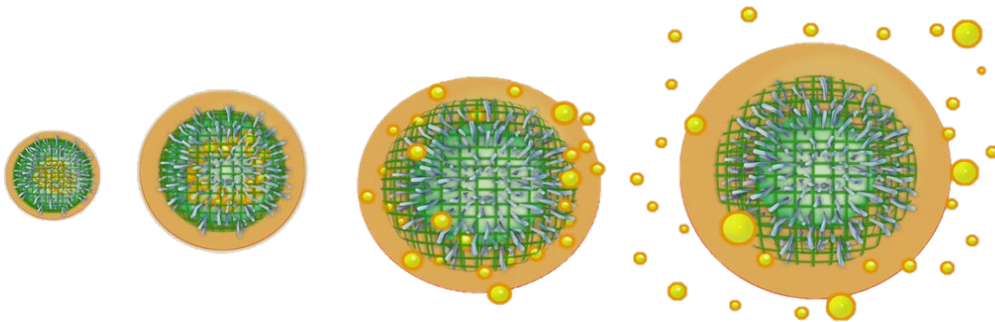


Figura 4. Representación de un nanogel en proceso de hinchamiento y liberación de fármaco.

Otro aspecto relevante es que tanto el tamaño de las partículas como sus grupos funcionales tienen un impacto significativo en biodistribución y la farmacocinética. Por ejemplo, las nanopartículas con carga positiva tienden a ser eliminadas más rápidamente que aquellas con carga negativa. En cuanto al tamaño, las partículas que oscilan entre 100 y 200 nm, si no están protegidas, son rápidamente eliminadas del torrente sanguíneo por el sistema fagocítico mononuclear (Jie Li et al. 2020; Rojas-Aguirre, Aguado-Castrejón, and González-Méndez 2016; S. et al. 2010).

La mayoría de los sistemas de nanoportadores operan aprovechando la vascularización permeable y el deficiente drenaje linfático de los tumores, que son resultados de la rápida y activa angiogénesis tumoral. Este fenómeno, conocido como permeabilidad y retención mejorada (EPR), facilita que los nanoportadores atraviesen la barrera endotelial y se acumulen en los tejidos tumorales, mientras dejan intacto el tejido sano circundante (figura 5) (Bozzuto and Molinari 2015; Peng et al. 2022).

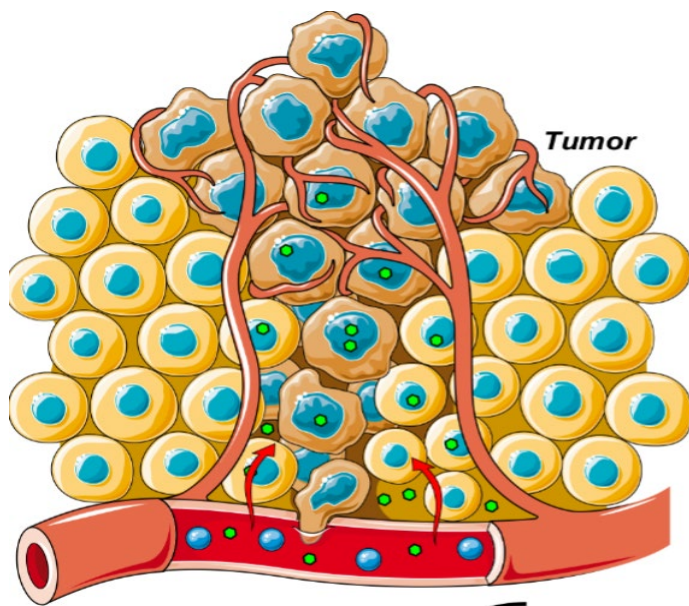


Figura 5. Representación del EPR.

Este enfoque prometedor representa un paso importante hacia terapias más efectivas y selectivas contra el cáncer, minimizando los efectos secundarios en tejidos sanos y maximizando el impacto del tratamiento en las células malignas (Shi et al. 2020).

2.3.1 NANOPORTADORES CATIÓNICO

Los vectores catiónicos juegan un papel fundamental en la facilitación de la absorción celular, como se ha demostrado en estudios que utilizan liposomas y micelas catiónicas en terapia génica. La introducción de nanoportadores catiónicos amplifica este proceso, promoviendo la endocitosis y permitiendo que cargas impermeables a la membrana celular, como fármacos hidrófobos o moléculas de ADN, sean transportadas y liberadas desde las endosomas para viajar hasta el destino deseado, en un fenómeno conocido como "escape endosómico" (Roointan et al. 2018; Schmalz et al. 2010).

En la actualidad, las partículas poliméricas y los nanogeles con carga catiónica están siendo ampliamente empleados en tecnologías biomédicas emergentes. Esto se debe a la fuerte interacción que existe entre el ADN y los coloides poliméricos catiónicos, así como al comportamiento expansible de las nanopartículas y nanogeles en ambientes ácidos y su capacidad para establecer enlaces específicos con proteínas, entre otros factores relevantes (Hegazy et al. 2020; Marek, Conn, and Peppas 2010).

Los sistemas de administración de fármacos han sido diseñados para aprovechar el pH como un mecanismo para mejorar la entrega de quimioterapéuticos. Los mecanismos de administración mejorados no solo pueden reducir los efectos secundarios, sino que también tienen el potencial de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Los vehículos de administración poliméricos sintetizados, basados en partículas y nanogeles de

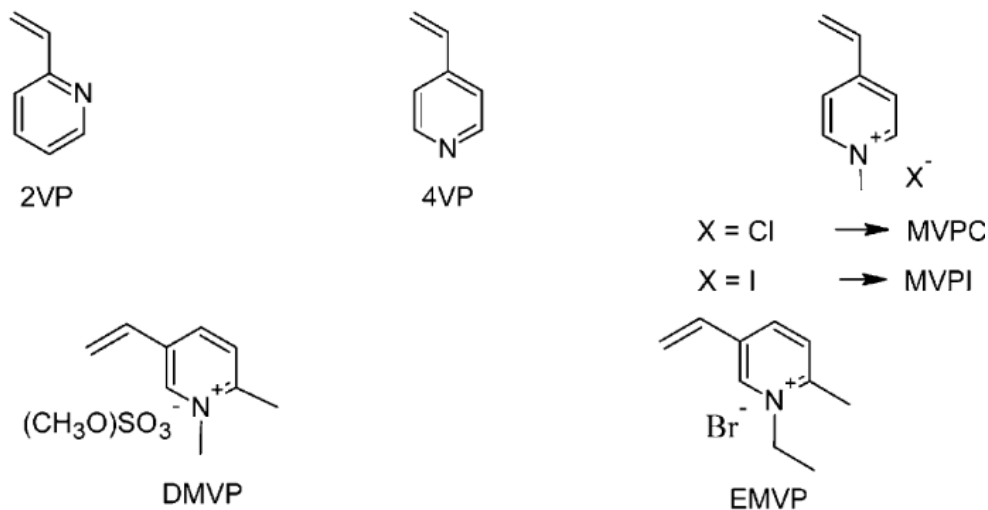
polímeros aniónicos convencionales sensibles al pH, exhiben un comportamiento de hinchamiento a pH alto. Sin embargo, este mecanismo no es adecuado para la entrega en los entornos ácidos presentes en los tejidos tumorales. Por lo tanto, es esencial que los vehículos de administración de fármacos presenten un comportamiento de hinchamiento ácido inverso, el cual se logra mediante la incorporación de monómeros catiónicos en su estructura. Este enfoque innovador promete revolucionar la administración de tratamientos oncológicos al optimizar la efectividad y minimizar los efectos adversos para los pacientes (Hayashi et al. 2004).

2.4 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CATIÓNICAS POR POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN

Las nanopartículas y nanogel con carga catiónica pueden ser preparados a través de varios procesos de polimerización, por ejemplo, polimerización por emulsión, esto involucra la utilización de reactivos catiónicos que se unen covalentemente a la nanopartícula o nanogel, como monómeros, polímeros e iniciadores, o que se adsorben físicamente en la superficie de la nanopartícula, como tensioactivos (Peres et al. 2017). El control de las condiciones experimentales durante el proceso de polimerización en emulsión permite obtener sistemas coloidales con tamaños de partículas, uniformidad y propiedades superficiales específicas, adecuadas para su aplicación en el ámbito biomédico. Un incremento en la concentración de monómero catiónico resulta en una velocidad de polimerización más rápida, mayores conversiones de polimerización, partículas de menor tamaño y una mayor formación de polímero soluble en agua en el proceso de polimerización en emulsión discontinua. El pH del medio de reacción

desempeña un papel crucial en la efectividad de la polimerización y la estabilidad de las nanopartículas generadas (Aracely Serrano-Medina et al. 2018). La elección de la familia de monómeros catiónicos depende del tipo de carga catiónica requerida. La utilización de monómeros catiónicos de amonio cuaternario produce nanopartículas catiónicas con densidades de carga superficial constantes. En cambio, se obtienen nanopartículas catiónicas con densidades de carga superficial dependientes del pH al emplear formas neutras de vinilpiridinas, como 2-vinilpiridina (2VP) o 4-vinilpiridina (4VP), y metacrilatos de (dialquilamino)etilo, tales como metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo (DMAEMA) o 2-(dietilamino)etil metacrilato (DEAEMA) (Figura 6) (Ramos, Forcada, and Hidalgo-Alvarez 2014).

Vinylpyridines and their quaternary ammonium salts



Dialkyl aminoethyl methacrylates

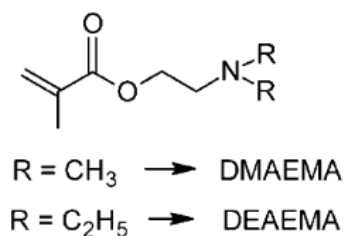
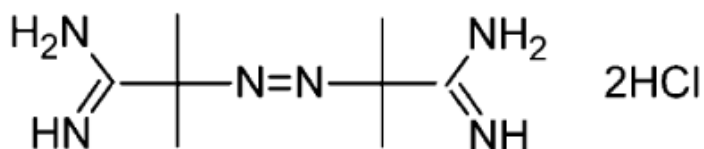


Figura 6. Monómeros catiónicos, formas neutras de vinilpiridinas.

Los iniciadores catiónicos más frecuentemente utilizados pertenecen a la familia de las azobisamidinas. Estos iniciadores pueden emplearse como catalizadores térmicos en la síntesis de coloides poliméricos catiónicos mediante el proceso de polimerización en emulsión. Las amidinas, que constituyen estos iniciadores, son bases fuertes monoácidas que sufren hidrólisis en presencia de catalizadores ácidos o básicos. La hidrólisis de amidinas es un proceso que ocurre en dos etapas. La primera etapa es la más rápida y resulta en la formación de una amina (el amoníaco forma amidinas no sustituidas) y una amida. La segunda etapa implica la hidrólisis de la amida para dar lugar a un ácido carboxílico; como las amidas son generalmente estables, esta segunda etapa suele ser más lenta. Sin embargo, la sensibilidad a la hidrólisis varía considerablemente según los sustituyentes presentes. AIBA es el iniciador catiónico más comúnmente empleado en la síntesis de nanopartículas y nanogeles catiónicos, (figura 7) (Su et al. 2020).



AIBA or V-50

Figura 7. AIBA, iniciador catiónico.

Los tensioactivos catiónicos más comúnmente empleados en la síntesis de nanopartículas catiónicas por polimerización en emulsión son las sales de amonio cuaternario, como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDETAB). Durante el proceso

de polimerización en emulsión, un surfactante desempeña un papel esencial. Primero, ayuda a solubilizar el monómero en la fase acuosa formando micelas hinchadas, lo que aumenta la disponibilidad del monómero en la fase continua. Además, estabiliza las nuevas partículas conforme se forman. Al aumentar la cantidad de tensioactivo, se mejora la estabilidad coloidal de las partículas y se reduce la coagulación. Además, el tensioactivo ejerce una influencia significativa en el tamaño de las partículas. Tanto el tipo como la cantidad de tensioactivo son determinantes en la etapa de nucleación de la polimerización en emulsión. Cuando la concentración de tensioactivo está por debajo de su concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de tensioactivo prefieren permanecer en la fase acuosa en lugar de formar micelas, permitiendo únicamente una nucleación homogénea (Dimde et al. 2017; Mehnath et al. 2020; Palomino et al. 2018; Sherly, MR, and V.S. 2020).

Los nanogeles, otro tipo de nanopartículas, son partículas coloidales reticuladas capaces de hincharse por absorción de disolvente sin disolverse debido a la estructura polimérica reticulada, ya sea física o químicamente. Su comportamiento está regido por la termodinámica de las cadenas poliméricas reticuladas y depende de los componentes y las interacciones específicas. Debido a esta capacidad de respuesta, se les denomina polímeros inteligentes (Hayashi et al. 2004; A. Serrano-Medina, Cornejo-Bravo, and Licea-Claveríe 2012).

El modelo de nucleación de micelas, propuesto por Harkins en 1947, establece que, durante esta polimerización, el iniciador se solubiliza en agua, mientras que el monómero es hidrófobo. En este proceso, el surfactante juega un papel clave al formar micelas con un tamaño que oscila entre 1 nm y 1 μ m, donde se aloja el monómero. Las micelas

activas contienen radicales libres y llevan a cabo la reacción de polimerización, mientras que las gotas de monómero son inactivas y funcionan principalmente como fuente de monómero. A medida que avanza la reacción, las gotas de monómero suministran monómero a las micelas activas, las cuales crecen para formar gotas de polímeros, dando lugar finalmente a la formación del nanogel. La mayoría del monómero se encuentra en forma de gotas, pero parte de él se introduce en las micelas, donde ocurre la hinchazón del nanogel. Este proceso da lugar a la formación del nanogel dentro de estas micelas, donde se dirigen los radicales libres generados en la fase acuosa (Argentiere et al. 2009; Bozzuto and Molinari 2015)

2.5 TÉCNICA DE ELECTROHILADO

La tecnología de electrohilado, reconocida como una antigua técnica redescubierta para satisfacer las demandas modernas, se ha convertido en un campo de intensa actividad tanto en laboratorios como en industrias de todo el mundo (Bulbul et al. 2019; Kamsani et al. 2021; Liu et al. 2021; Ren et al. 2018).

Esta técnica se conoce desde 1934, año en que se presentó la primera patente relacionada con el electrohilado. El proceso de electrohilado puede llevarse a cabo utilizando polímeros fundidos o disueltos en solución. La mayoría de la investigación publicada sobre electrohilado se ha centrado en el método basado en soluciones, en lugar del electrohilado por fusión, debido a las que se necesita mayor inversión de capital y a la dificultad asociada con la producción de fibras nanométricas mediante el electrohilado por fusión. En la Figura 8 se muestra un diagrama ilustrativo que muestra el proceso de electrohilado de nanofibras poliméricas (Villarreal-Gómez et al. 2021).

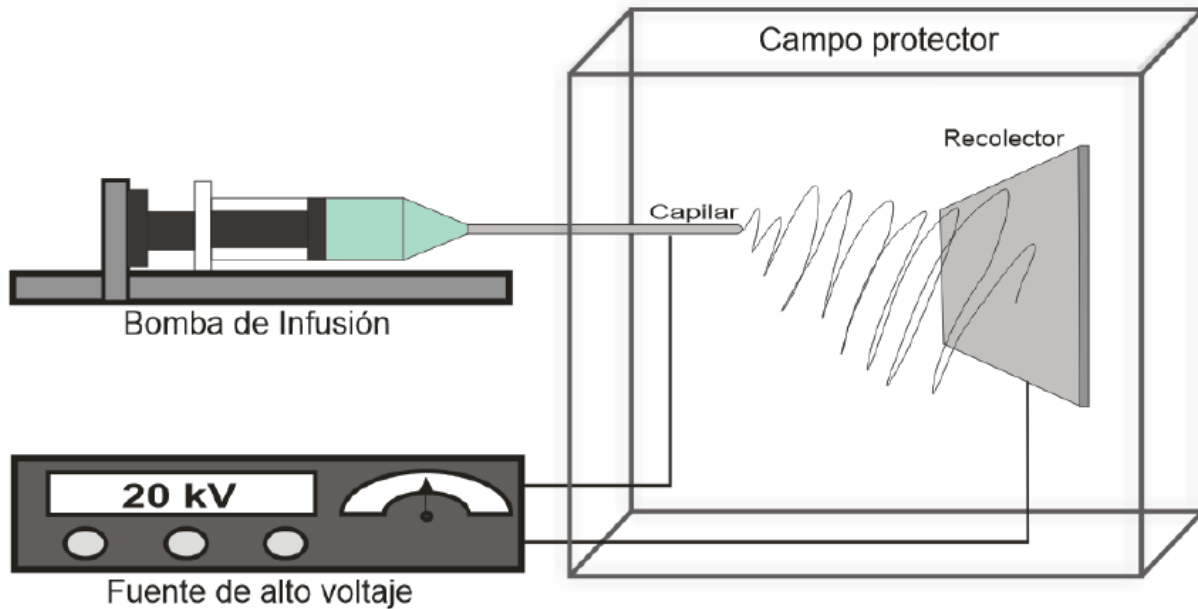


Figura 8. Electrohilado.

Principalmente, este proceso implica tres componentes principales: un generador de alto voltaje, un tubo capilar equipado con una aguja de pequeño diámetro y una pantalla colectora de metal (Fadil et al. 2021; J. Wang et al. 2018).

Este proceso de producción es fundamental en la creación de nanofibras poliméricas y ofrece una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. En el proceso de producción de nanofibras por electrohilado, se aplica un alto voltaje, generalmente de 0 a 30kV conectado a la aguja de la jeringa con la solución polimérica, para generar un chorro de solución polimérica con carga eléctrica, mientras que en el colector se conecta una carga opuesta. En la punta de la aguja se forma una gota de la solución polimérica que queda bajo la acción de dos tipos de fuerzas electrostáticas: la repulsión electrostática mutua entre las cargas superficiales y la fuerza de Coulomb aplicada por el campo eléctrico externo. Debido a estas interacciones electrostáticas, la

gota de fluido se alarga formando un objeto cónico conocido como cono de Taylor (Villarreal-Gómez et al. 2016). Antes de alcanzar la pantalla colectora que está cargada con la fuerza opuesta y conectado a tierra, en el chorro de solución se evapora el disolvente y solidifica, recogiendo como una red entrelazada de nanofibras. Un aspecto interesante del uso de las nanofibras es su capacidad de modificación no solo en términos de morfología y volumen interno, sino también de su estructura superficial para incorporar diversas funcionalidades. Por ejemplo, los tamaños, el proceso de electrohilado permite la producción de fibras que varían en tamaño desde 10 nm hasta más de 1000 nm. Otro Ejemplo es el tipo de polímero, se han empleado una amplia variedad de polímeros para electrohilar nanofibras, incluyendo polímeros naturales como colágeno, gelatina, quitosano, ácido hialurónico y fibroína de seda (Lan et al. 2021; Rath et al. 2016).

La simplicidad del proceso de electrohilado lo hace único, permitiendo su aplicación exitosa en la producción a gran escala fuera del entorno de laboratorio.

Para la fabricación en masa de tejidos basados en nanofibras electrohiladas se requiere un control preciso del proceso de electrohilado. Aunque el electrohilado es un método sencillo y rentable, es un proceso complejo que depende de diversos parámetros técnicos y de procesamiento. Es fundamental tener un control adecuado sobre estos factores para asegurar la calidad y funcionalidad de las nanofibras producidas a gran escala. Esta necesidad de control se vuelve aún más crucial debido a la creciente demanda de productos basados en nanofibras en diversas aplicaciones industriales y biomédicas (M. Chen et al. 2012; Haider, Haider, and Kang 2018; Vathaluru et al. 2017).

2.5.1 ELECTROHILADO COAXIAL (CO-ELECTROHILADO)

El co-electrohilado es una técnica avanzada utilizada en la fabricación de fibras, una variante del electrohilado simple, que implica la inyección simultánea de dos fases líquidas inmiscibles. Este proceso aprovecha la inestabilidad dinámica de las gotas de solución de hilado bajo un voltaje relativamente alto, lo que resulta en la formación de un cono de Taylor en la boquilla de la aguja. Este cono se estira en fibras ultrafinas y continuas durante un proceso de caída rápido. Lo distintivo del co-electrohilado radica en la producción de macro/nanofibras con una estructura de capa central (N. Wang and Zhao 2018).

En el electrohilado coaxial, es crucial mantener un control preciso sobre las velocidades de flujo tanto de la fase interna como de la fase externa. Este control meticuloso asegura la formación adecuada de las fibras coaxiales con la estructura interna deseada. En este proceso, se han empleado diversos materiales centrales, incluyendo polímeros comunes, alcano/aceite, nanopartículas inorgánicas (NP) y copolímeros de bloque (BCP). Esta variedad de opciones ha ampliado significativamente las aplicaciones del co-electrohilado (Ghafoor et al. 2018; Kalva et al. 2021).

La versatilidad del co-electrohilado ha revolucionado la fabricación de fibras, permitiendo no solo el control de la estructura interna de las fibras, sino también la integración de propiedades específicas. Esta técnica se ha utilizado en campos tan diversos como la ciencia de materiales, la nanotecnología y la ingeniería biomédica, abriendo nuevas posibilidades para la creación de materiales avanzados con aplicaciones prácticas y científicas (Ghafoor et al. 2018; Mehdi Khanmohammadi, Vahid Zolfagharzadeh, Zohreh Bagher and A 2019; Pant, Park, and Park 2019).

2.5.2 NANOFIBRAS POLIMERICAS

Las nanofibras poliméricas suelen producirse mediante la técnica de electrohilado, la cual permite la creación de fibras con diámetros que varían desde los 10 nm hasta varios cientos de nanómetros (Bhattarai et al. 2019; Juncos Bombin, Dunne, and McCarthy 2020; Sydow et al. 2019).

El electrohilado se destaca por su versatilidad, permitiendo la producción de una amplia variedad de morfologías de fibras. Estas nanofibras pueden ser diseñadas con diversas estructuras morfológicas, como núcleo-coraza, hueca o porosa, y pueden ser dispuestas de forma alineada o aleatoria en la malla de nanofibras. Esta flexibilidad se logra mediante el uso de copolímeros únicos o combinados, junto con la incorporación de materiales aditivos. Estas nanofibras pueden formar estructuras potenciales para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Más recientemente, se ha demostrado que las nanofibras de proteínas tienen un uso prometedor en la ingeniería de tejidos.

Algunas características y aplicaciones de las nanofibras poliméricas incluyen:

Tamaño ultrafino: Las nanofibras tienen un diámetro extremadamente pequeño, lo que les confiere una gran área superficial en comparación con su masa, lo que es útil en aplicaciones como filtración y refuerzo de materiales compuestos (Duan et al. 2021).

Alta relación superficie-volumen: Debido a su pequeño tamaño, las nanofibras tienen una gran área superficial en comparación con su volumen, lo que las hace útiles en aplicaciones de catálisis, sensores y dispositivos biomédicos (Ghaffari-Bohlouli, Zahedi, and Shahrousvand 2020).

Porosidad controlada: Las nanofibras pueden tener una estructura porosa controlada, lo que las hace adecuadas para aplicaciones en membranas filtrantes y materiales de liberación controlada.

Flexibilidad y resistencia: A pesar de su tamaño pequeño, las nanofibras pueden ser flexibles y al mismo tiempo tener una resistencia mecánica adecuada, lo que las hace útiles en aplicaciones textiles y de refuerzo para materiales compuestos.

Aplicaciones biomédicas: Las nanofibras poliméricas se utilizan en ingeniería de tejidos para crear estructuras que imitan el entorno natural de las células. También se utilizan en la liberación controlada de fármacos y en dispositivos de diagnóstico. Las propiedades únicas de las esteras electrohiladas, como su amplia superficie específica y poros pequeños, resultan altamente beneficiosas para la absorción de líquidos y la prevención de la penetración de bacterias. Esto las convierte en una opción idónea para promover la cicatrización de heridas (Felipe et al. 2019; Rahma et al. 2016).

Filtración y purificación: Debido a su pequeño tamaño de poro y gran área superficial, las nanofibras se utilizan en filtros de aire y agua para eliminar partículas y contaminantes (Vargas-Molinero et al. 2023).

Electrónica flexible: Las nanofibras poliméricas se han utilizado en la fabricación de dispositivos electrónicos flexibles debido a su flexibilidad y conductividad eléctrica.

En resumen, las nanofibras poliméricas son materiales versátiles con una amplia variedad de aplicaciones en campos como la medicina, la industria textil, la electrónica y el medio ambiente, debido a sus propiedades únicas derivadas de su tamaño nanométrico y su alta relación superficie-volumen (Torres-Martínez et al. 2019).

2.6 INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A NANOFIBRAS PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE SUMINISTRO DE FÁRMACOS Y/O BIOMOLÉCULAS

Las nanofibras presentan desventajas como la liberación inmediata del fármaco o una baja resistencia mecánica. Similarmente, las nanopartículas no están exentas de limitaciones, tales como la liberación inmediata del fármaco, pérdida de fármaco, incapacidad para lograr una liberación controlada o sostenida, problemas con la carga múltiple de fármacos, falta de adherencia celular, y baja capacidad de direccionamiento, entre otras. Estos problemas pueden minimizarse o resolverse al integrar nanofibras y nanopartículas en un mismo sistema. Asimismo, los beneficios de las nanofibras, como la prevención de la degradación fisicoquímica del fármaco, alta capacidad de carga, mayor porosidad, y las ventajas inherentes a las nanopartículas, como el aumento de la solubilidad en fármacos no solubles, mejora de la absorción y aumento de la penetración celular, se acumulan en un sistema de liberación que incluye ambas nanopartículas y nanofibras (Shetty, Bhandari, and Yadav 2022).

Un ejemplo de estas ventajas se observa en enfermedades como el cáncer, donde las nanofibras pueden utilizarse para administrar medicamentos en ubicaciones específicas. Dado que las nanofibras contienen nanopartículas cargadas con el fármaco y se colocan en el sitio de acción, pueden emplearse como dispositivos de administración orientados a liberar el fármaco únicamente en el tejido enfermo. Otra ventaja de estos sistemas de liberación es la posibilidad de lograr la encapsulación simultánea de múltiples fármacos y/o biomoléculas. En el caso de requerirse la administración de más de un fármaco o agente terapéutico, este nanosistema tendría la ventaja de realizar una entrega simultánea, ya sea cargando ambas moléculas en las nanopartículas o cargando un fármaco en las nanopartículas mientras que otro se añade a las nanofibras (Krogstad et al. 2017; Mohamady Hussein et al. 2021).

Combinar estas dos técnicas de administración permite crear un sistema avanzado de administración que involucra tanto nanofibras como nanopartículas. Incluso si el fármaco se filtra de las nanopartículas, la nanofibra actuará como protección, asegurando que el fármaco permanezca en el sistema de administración y no se libere prematuramente. Las nanopartículas pueden ser, adsorbidas, atrapadas y encapsuladas en las nanofibras de diversas formas. Aunque las nanopartículas adheridas y atrapadas son similares en apariencia, difieren en la disposición de las nanopartículas sobre y dentro de las nanofibras, pudiendo observarse cambios en la homogeneidad y suavidad de las esteras nanofibrosas. La elección de estos mecanismos depende del uso previsto y del tipo de enfermedad(Amini et al. 2020; Choukaife, Doolaanea, and Alfatama 2020).

2.6.1 INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A NANOFIBRAS POR ADSORCIÓN

Una estrategia para integrar las nanopartículas con carga de fármaco a las nanofibras es mediante la adsorción. Este proceso sencillo implica sumergir la matriz de nanofibras en una solución que contenga las nanopartículas. El éxito de la unión de las nanopartículas a las nanofibras depende de la presencia de interacciones iónicas que generen una fuerza de atracción electrostática, permitiendo así que las nanopartículas se adhieran a las esteras de nanofibras. Este sistema de liberación no solo es biocompatible sino también bioactivo, convirtiéndose en la opción preferida para aplicaciones terapéuticas que requieran un sistema de administración que se adhiera a las células. La adherencia de nanopartículas a las nanofibras ofrece la ventaja de mejorar la adhesión celular inicial, así como la proliferación y viabilidad celular (Mohamady Hussein et al. 2021).

2.6.2 INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A NANOFIBRAS POR ENCAPSULACIÓN

La elección de encapsular nanopartículas responde a la necesidad de lograr una liberación controlada y sostenida de fármacos o moléculas bioactivas. La encapsulación de nanopartículas en nanofibras posibilita una liberación más prolongada del fármaco, al mismo tiempo que garantiza su seguridad mediante la degradación fisiológica. Se ha evidenciado que las matrices fibrosas, al cargar directamente los fármacos en las nanofibras, minimizan la pérdida de estos compuestos. El proceso de encapsulación implica la preparación previa de nanopartículas cargadas con el fármaco, las cuales se integran y mezclan con la solución de polímero. La electrohilatura de esta solución resulta en la formación de nanofibras con las nanopartículas encapsuladas en su interior (Mehnath et al. 2020).

Este enfoque se justifica debido a que, durante el proceso de electrohilatura, las nanopartículas tienden a concentrarse en el centro de la solución polimérica antes de ser descargadas a través de la jeringa. Este fenómeno ocasiona un efecto de alargamiento a lo largo de la dirección del flujo del líquido en el aire. Como consecuencia, las nanopartículas quedan atrapadas dentro de las nanofibras en lugar de ubicarse en sus superficies. Este método asegura una distribución homogénea y una integración eficaz de las nanopartículas en la estructura de las nanofibras, mejorando así la eficiencia del sistema de administración (Vlachopoulos et al. 2022).

2.6.3 INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A NANOFIBRAS POR ATRAPAMIENTO

Otra estrategia para desarrollar un sistema de administración basado en nanofibras y nanopartículas implica la captura de nanopartículas cargadas con fármacos en matrices de nanofibras poliméricas. La interacción entre las nanopartículas y la superficie de las nanofibras depende del tamaño de los poros en estas últimas. Los poros más grandes y abiertos facilitan la retención de las nanopartículas en la estructura de las nanofibras. En este proceso, las nanopartículas atrapadas no experimentan fuerzas de unión significativas, como enlaces químicos o fuerzas electrostáticas. En cambio, quedan retenidas en los poros o espacios entre las nanofibras (X. Chen, Xu, and He 2019).

Hasta ahora, el atrapamiento de nanopartículas en nanofibras se ha aplicado principalmente en contextos relacionados con la curación de heridas. Sin embargo, es esencial profundizar en la investigación para extender esta técnica a diversas aplicaciones farmacológicas. Cabe destacar que los términos "encapsulación" y "atrapamiento" de nanopartículas son a menudo intercambiados, pero representan mecanismos distintos, y es crucial no confundirlos (Atashgahi et al. 2021).

Además, una técnica relacionada que merece mención es el electrospray, un método basado en la carga eléctrica que se utiliza para producir partículas finas a partir de soluciones líquidas. En el electrospray, una solución que contiene nanopartículas se bombea a través de una aguja cargada eléctricamente, generando una neblina de pequeñas gotas cargadas. Estas gotas, al perder solvente durante su vuelo hacia un colector, forman partículas secas. El electrospray ofrece una forma eficaz de producir partículas con un tamaño controlado, lo que podría ser complementario al atrapamiento de nanopartículas en nanofibras para lograr sistemas de administración de fármacos más

versátiles y eficientes (Guo et al. 2019; Khoshnoudi-Nia, Sharif, and Jafari 2020; Pour Khalili, Parsa, and Moradi 2022; Zhou, Modi, and Biswas 2022)

2.7 ANDAMIOS DE NANOFIBRAS COMO SISTEMAS LOCALIZADOS DE SUMINISTROS DE FÁRMACOS

Los Sistemas Localizados de Suministro de Fármacos, conocidos como "LDDS" por sus siglas en inglés, representan un avance revolucionario en la administración terapéutica, especialmente en el tratamiento del cáncer. Estos sistemas están estratégicamente diseñados para posicionarse directamente en el sitio del tumor, lo que permite mantener una dosis terapéutica eficaz durante un periodo prolongado. Lo distintivo de los LDDS radica en su capacidad para minimizar la concentración del fármaco en la circulación sanguínea, mitigando así los efectos adversos en tejidos y órganos normales (Cen et al. 2020).

La implementación exitosa de los LDDS se debe al ingenioso empleo de la nanotecnología. Los investigadores han dedicado sus esfuerzos al desarrollo y estudio de tecnologías conjuntas que amalgaman las ventajas de sus componentes individuales, convirtiéndolos en sistemas multifuncionales. Estos andamios multifuncionales exhiben una arquitectura nanofibrosa que se asemeja a la matriz extracelular y poseen propiedades mecánicas similares a las de los tejidos blandos. Esta característica los posiciona como candidatos excepcionales para aplicaciones en ingeniería de tejidos, destacando su utilidad en parches para facilitar la reparación y regeneración de tejidos en áreas afectadas por el cáncer post-cirugía.

Un aspecto innovador de estos andamios multifuncionales es su capacidad para administrar nanopartículas teranósticas de manera localizada. Este proceso se logra mediante la rápida degradación de microesferas estructuradas núcleo-cubierta, que contienen estas nanopartículas o fármacos antineoplásicos. La administración transdérmica de fármacos, basada en nanofibras, se revela como una plataforma altamente prometedora, capaz de proporcionar de manera eficiente el fármaco directamente en los sitios tumorales (Jiang et al. 2021; Khodadadi et al. 2020).

Este enfoque integrador representa un hito en la evolución de las terapias oncológicas, ofreciendo una solución precisa y focalizada para combatir el cáncer. La continua investigación y desarrollo en este campo prometen desbloquear nuevas posibilidades y refinamientos, impulsando aún más la eficacia y aplicaciones de los Sistemas Localizados de Suministro de Fármacos en el tratamiento del cáncer (Zhu et al. 2018).

2.8 SISTEMAS DE LIBERACIÓN TOPICO

En 1979, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) otorgó la aprobación al primer parche transdérmico, destinado al tratamiento del mareo. Posteriormente, a mediados de la década de 1980, las compañías farmacéuticas iniciaron el desarrollo de un parche de nicotina como herramienta para ayudar a los fumadores a dejar el hábito. Para finales de 1991 y principios de 1992, la FDA dio su aprobación a cuatro parches de nicotina, consolidando así la presencia de esta innovadora forma de administración de medicamentos. En los últimos tiempos, el sistema de administración transdérmica de fármacos ha emergido como un campo de gran interés en la investigación y desarrollo farmacéutico (Ng et al. 2010; Prausnitz and Langer 2008).

La administración transdérmica de fármacos se realiza mediante parches que constan de capas específicas y diferenciadas. Los componentes de los dispositivos transdérmicos incluyen matriz polimérica, fármaco, potenciadores de permeación y excipientes; está estructurado generalmente de la siguiente manera:

1- Forro: protege el parche durante el almacenamiento. El revestimiento se retira antes de su uso.

2- Fármaco: solución de fármaco en contacto directo con el revestimiento antiadherente.

3- Adhesivo: sirve para adherir los componentes del parche además de adherir el parche a la piel.

4- Membrana: controla la liberación del fármaco desde el reservorio y los parches multicapa.

5- Respaldo "Backing": protege el parche del entorno exterior.

Existen varios diferentes tipos de parches TDDS, haciendo mención a los más fundamentales tenemos el sistema de fármaco en adhesivo de una sola capa se caracteriza por la inclusión del fármaco directamente dentro del adhesivo en contacto con la piel. En este diseño de sistema transdérmico, el adhesivo no sólo sirve para fijar el sistema a la piel, sino que también sirve como formulación, que contiene el fármaco y todos los excipientes bajo una única película de soporte (Monika et al. 2012). La velocidad de liberación del fármaco desde este tipo de sistema depende de la difusión a través de la piel. El de fármaco en adhesivo multicapa, la multicapa abarca la adición de una membrana entre dos capas distintas de fármaco en adhesivo o la adición de múltiples capas de fármaco en adhesivo bajo una única película de soporte. El de sistema reservorio transdermal, este incluye un compartimento que contiene el fármaco en

solución. EL de diseño de matriz que como su nombre lo dice, está formado por una matriz semisólida que contiene una solución o suspensión de fármaco (Figura 9). Parches de vapor, la capa adhesiva no sólo sirve para adherir las distintas capas sino también para liberar vapor, este se emplea para la liberación de aceites esenciales.

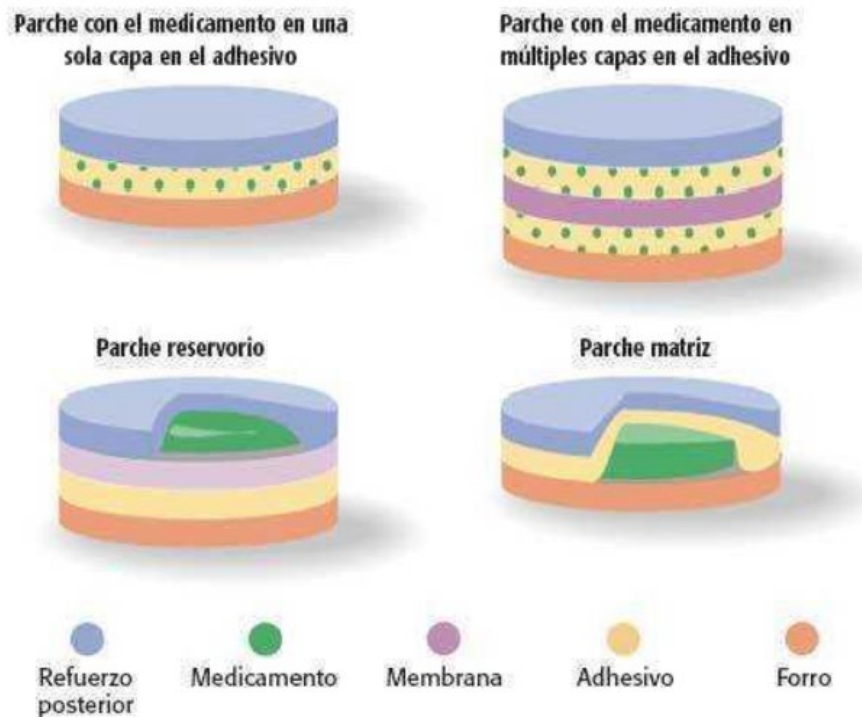


Figura 9. Estructura de 4 de los principales modelos de parches TDDS.

Los enfoques de administración transdérmica tienen ventajas significativas en el tratamiento de enfermedades cutáneas, ya que evitan el metabolismo de primer paso y regulan la velocidad de absorción del fármaco a lo largo de un periodo extendido. Esta modalidad ha emergido como uno de los métodos más prometedores en los sistemas actuales de administración de medicamentos. Al dirigirse directamente a la piel, los fármacos administrados de esta manera eluden el tracto gastrointestinal, reduciendo así el riesgo de efectos secundarios como disfunción hepática e irritación gastrointestinal (Y. Han et al. 2022; Monika et al. 2012; Ruby, Pathak, and Aggarwal 2014).

La estructura fisiológica distintiva de la piel proporciona una excelente plataforma para la administración de agentes terapéuticos, aprovechando la rica red vascular y linfática cutánea, conectada de manera integral con el resto del organismo. La piel, además de ser un punto de entrada para medicamentos, funge como un reservorio que posibilita la liberación continua del fármaco absorbido durante períodos prolongados. Esto resulta particularmente beneficioso para la liberación controlada y sostenida de compuestos con vidas medias biológicas cortas, que requieren una frecuencia elevada de administración (Haghniaz et al. 2023; X. Han et al. 2020; Joshi, Azizi Machekeposhti, and Narayan 2023). No obstante, existen desafíos en la recuperación posoperatoria de pacientes con cáncer, donde complicaciones como la disfunción tisular o discapacidades derivadas de la resección del tejido pueden incidir negativamente. Asimismo, la recurrencia del cáncer debido a células residuales representa una preocupación. A pesar de los notables avances en andamios de ingeniería de tejidos para la regeneración postoperatoria en pacientes con cáncer, muchos de estos andamios carecen aún de funciones para monitorear y eliminar células cancerosas residuales tras su detección.

Los sistemas de administración transdérmica de fármacos basados en nanoportadores han sido exhaustivamente investigados por los científicos. Tras la aplicación cutánea, estos nanoportadores tienen la capacidad de alcanzar diversas capas de la estructura de la piel, y esta penetración está determinada por sus propiedades físicas y químicas. Los nanoportadores presentan una serie de beneficios cruciales para la administración transdérmica de fármacos. Estos incluyen:

- Mejora de la penetración en la piel mediante la alteración de las capas lipídicas.
- Posibilidad de incorporar agentes bioactivos y funciones diagnósticas.

- Mejora de la estabilidad de los fármacos cargados.
- Aumento de la biodisponibilidad de los fármacos mediante el control de los perfiles farmacocinéticos.
- Reducción de los efectos secundarios tóxicos.
- Consecución de una orientación precisa.

El diseño de nanomedicina puede centrarse en la expresión de varios marcadores de superficie y citocinas en el microambiente de la piel afectada, lo que se convierte en objetivos clave. Es esencial resaltar que los avances actuales en la comprensión de las vías y funciones moleculares específicas de las enfermedades cutáneas permiten la identificación de nuevos objetivos, generando así nuevas estrategias terapéuticas basadas en nanoportadores y propiciando la era de una medicina personalizada.

Además, los nanoportadores capaces de responder a estímulos endógenos o externos se consideran medicamentos inteligentes con propiedades de liberación controlada o bajo demanda, mejorando significativamente los resultados del tratamiento (Barbosa et al. 2023; Haghniaz et al. 2023; He et al. 2023).

CAPÍTULO III
EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

A) Equipos.

1. Agitador magnético VWR Dyla-Dual.
2. 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 (10 µL/1mL) con agua destilada y filtrada con filtro de 0.2 µm de diámetro de poro.
3. Equipo de filtración.
4. Potenciómetro HANNA Modelo 2210
5. Equipo purificador de agua desionizada Barnstead Sybron, modelo D2604, en todos los experimentos y caracterizaciones se utilizó agua desionizada y filtrada con filtros de 0.2 µm diámetro de poro.
6. Espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Coulter DU520)
7. Sistema liofilizador. Se utilizó el equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 ciclos.
8. Espectrómetro FT-IR Nicolet iS10 de Thermo Scientific, FT-IR: Número de barridos: 8, de 4000 a 450 cm⁻¹, resolución 4, intervalo de 2.0 cm⁻¹
9. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) JSM-7800F, Prime.
10. Microscopio de emisión de campo JEOL JSM 7600F con un voltaje acelerado de 20 kV.
11. TA instruments SDT Q600 V20 Thermal Gravimetric.
12. Incubadora

13. Lector de microplaca
14. Recirculador
15. Spinneret electrostático, ensamblado en el laboratorio de biomateriales UABC/ECITEC ensamblado por Velasco et al.
16. Bomba de infusión
17. Analizador de textura Brookfield CT3
18. Celdas de Franz
19. Homogenizador
20. Centrifuga

B) Reactivos y solventes

Acetato de etilo

Acetato de uranilo

Acetonitril

Ácido Clorhídrico, 37.4%

Ácido fórmico

Ácido fosfotúngstico

Agua destilada

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

Cloroformo

Cloruro de sodio

Diclorometano

Dimetil sulfóxido

Tampón Fosfato Salino (PBS pH 1,3,4,5, 6, 7, 7.4, 8 y 9)

Etilenglicoldimetacrilato

Hexano

Metacrilato de n,n-dietilaminoetilo

Metanol

Policaprolactona

Polivinilpirrolidona

Tetrahidrofurano (THF)

2,2'-azobis(2-metilpropionamida)

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

C) Gases

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

D) Materiales e insumos

Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO: 3,500. 10.0 mm

Membrana para diálisis, Spectra/Por MWCO: 15,000. 10.0 mm

400 mesh Cu Lacey Carbón” con número de serie 141089, SPI supplies.

3.2 SÍNTESIS DE NANOGELES CATIONICOS DE METACRILATO DE N,N-DIETILAMINOETILO (DEAEM)

Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó el método de 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, aunque un porcentaje pequeño del monómero se disuelve también en el medio; y parcialmente en forma de micelas cubiertas de detergente dependiendo la concentración del emulsificante. La relación de volumen entre las fases, por lo general es 0.1-0.5 y la polimerización se lleva de 80 a 85°C. La mezcla para la polimerización en fase inicial de la emulsión se representa con un esquema general de la metodología que se muestra en la figura 10.

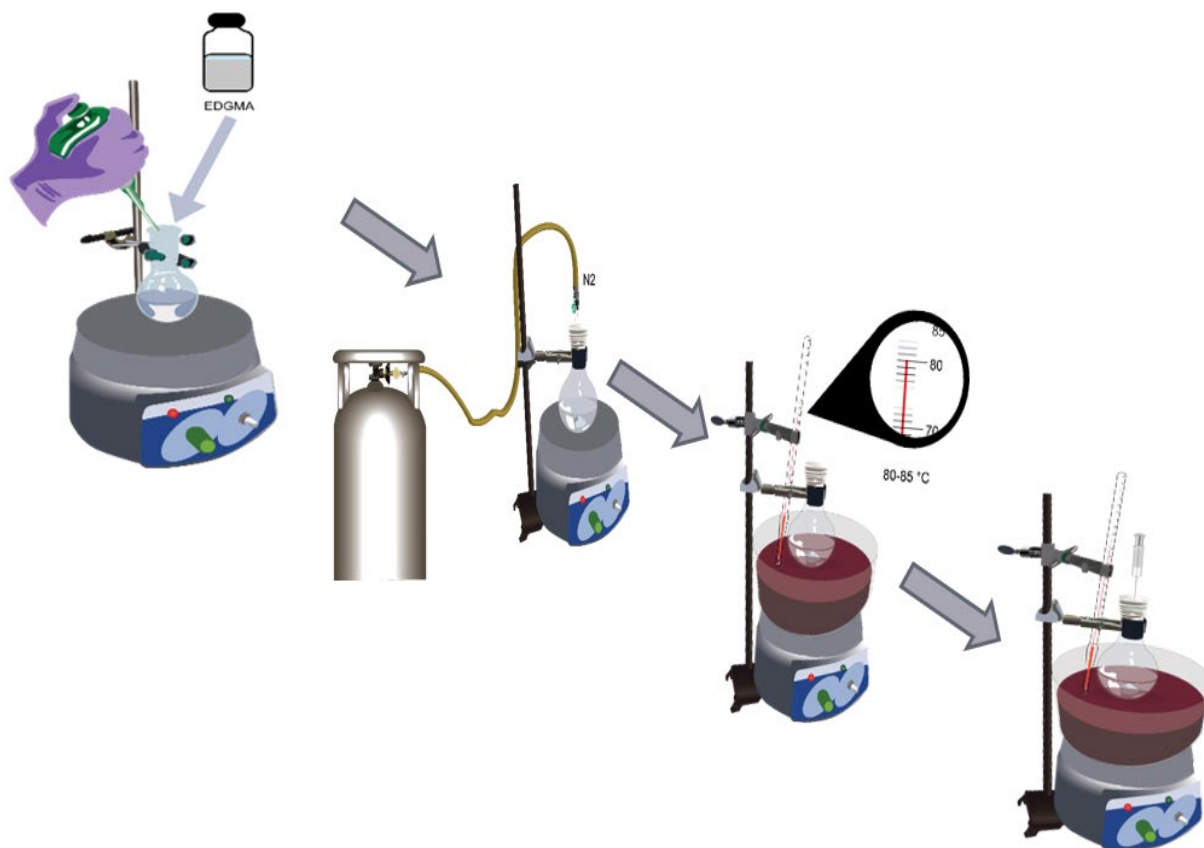


Figura 10. Esquema general de metodología para la síntesis de nanogeles.

3.2.1 SÍNTESIS DE NANOGELES CATIÓNICOS DE METACRILATO DE N,N-DIETILAMINOETILO (DEAEM) ENTRECruzADOS CON EGDMA

El procedimiento general para la síntesis de los nanogeles n, n-dietilaminoetilo (DEAEM), se describe a continuación: El monómero DEAEM (185.25 g/mol) se pesó para tener una proporción al 1% w/w: 0.1g de DEAEM. Se obtiene los moles totales con la formula siguiente:

$$nT_{\text{monómero}} = \frac{M_{\text{gramos}}}{PM}$$

y el entrecruzante (EGDMA 198.22g/mol) se pesó (según el 5% molecular obtenido con la formula siguiente:

$$(nT_{\text{monómero}})(PM_{\text{Entrecruzante}})(\%_{\text{Entrecruzante}}) = M_{\text{gramos entrecruzante}}$$

Antes de utilizar el entrecruzante se procedio a purificar el entrecruzante por una columna empacada con removedor del inhibidor de hidroquinona. Se utilizó la fórmula de la densidad para obtener los microlitros necesarios agregando 5% o 3% de EGDMA y, más 0.090 g de tensoactivo catiónico (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), se mezcló y se disolvió en agua destilada a temperatura ambiente para formar una solución acuosa. Las cantidades usadas de reactivos se muestran en la tabla 1.

En un matraz bola con la solución acuosa de entrecruzante, se agregó agua para obtener un volumen de 50 mL, se agregó el monómero al 1%, se mantuvo en agitación constante hasta finalizar la reacción. Se eliminó cualquier oxígeno disuelto en la mezcla mediante burbujeo con nitrógeno durante 30 minutos. La mezcla de reacción se colocó en el baño de aceite a 70° C y se mantuvo en agitación constante. Posteriormente se añadió un iniciador térmico catiónico (AIBA 271.19g/mol). En una proporción de 2% molecular, para conocer la cantidad necesaria se utilizó la formula siguiente:

$$(nT_{\text{monómero}})(PM_{\text{Iniciador}})(\%_{\text{iniciador}}) = M_{\text{gramos iniciador}}$$

Nota: Se hizo una solución acuosa de la siguiente manera, 0.5mL de agua (DDI) más el 2% de iniciador.

Se dejó reaccionar durante 45 min aproximadamente, es necesario mantener la reacción en observación para prevenir un posible precipitado. Una vez terminados los 45 min de la reacción de polimerización, se sacó del baño de aceite, para que se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una alícuota para medir el diámetro hidrodinámico

Tabla 1. Porcentajes y pesos de reactivos para la síntesis de nanogeles con EGDMA.

Reactivo	Porcentaje	Peso	Volumen
Monómero			
DEAEM	1%	500mg	536uL
EGDMA	5%	26.8mg	25uL
Iniciador AIBA	2%	14.6mg	0.5mL

3.2.2 SÍNTESIS DE NANOGELES CATIÓNICOS DE METACRILATO DE N,N-DIETILAMINOETILO (DEAEM) ENTRECruzADOS CON DVA

El procedimiento general para la síntesis de los nanogeles n,n-dietilaminoetilo (DEAEM), se describe a continuación: El monómero DEAEM (185.25 g/mol) se pesó para tener una proporción al 1% w/w: 0.1g de DEAEM. Se obtiene los moles totales con la formula siguiente:

$$nT_{\text{monómero}} = \frac{M_{\text{gramos}}}{PM}$$

y el entrecruzante (DVA 212.24 g/mol) se pesaron (según el 5% molecular obtenido con la formula siguiente:

$$(nT_{\text{monómero}})(PM_{\text{Entrecruzante}})(\%_{\text{Entrecruzante}}) = M_{\text{gramos entrecruzante}}$$

Las cantidades usadas de reactivos se muestran en la tabla 2. En un matraz bola se agregó un volumen de 50mL de agua destilada, lo equivalente a 5% molecular del entrecruzante DVA, y se agregó el monómero al 1%, se mantuvo en agitación constante hasta finalizar la reacción.

Se eliminó cualquier oxígeno disuelto en la mezcla mediante burbujeó con nitrógeno durante 30 minutos. La mezcla de reacción se colocó en el baño de aceite a 70° C y se mantuvo en agitación constante. Posteriormente se añadió un iniciador térmico catiónico (AIBA 271.19 g/mol). En una proporción de 2% molecular, para conocer la cantidad necesaria se utilizó la formula siguiente:

$$(nT_{\text{monómero}})(PM_{\text{Iniciador}})(\%_{\text{iniciador}}) = M_{\text{gramos iniciador}}$$

Nota: Se hizo una solución acuosa de la siguiente manera, 0.5mL de agua (DDI) más el 2% de iniciador. Se dejó reaccionar durante 25 min aproximadamente, es necesario mantener la reacción en observación para prevenir un posible precipitado. Una vez terminados los 25 min de la reacción de polimerización, se sacó del baño de aceite, para que se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una alícuota para medir el diámetro hidrodinámico

Tabla 2. Porcentajes y pesos de reactivos para la síntesis de nanogeles con DVA.

Reactivo	Porcentaje	Peso	Volumen
Monómero DEAEM	1%	500 mg	536 µL

DVA	5%	28.6 mg	N/A
Iniciador AIBA	2%	14.6 mg	0.5 mL

3.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS NANOGELES

Los nanogeles contienen diversas cantidades de disolventes orgánicos residuales, monómeros, tensioactivos, sales inorgánicas, iniciadores, aceleradores y agregados de polímeros no incorporados al sistema nanométrico. La presencia de estas impurezas debe mantenerse a un nivel muy bajo, para evitar reacciones adversas dentro del organismo humano (Claudio-rizo et al. 2021). Normalmente, las nanopartículas se purifican por diálisis con el uso de membranas de celulosa semipermeables. Con el tiempo, la velocidad en la difusión de impurezas a través de la membrana disminuye a valores extremadamente bajos, con una disminución paralela de la concentración de impurezas en el producto retenido de la solución donadora, durante el proceso (Escalona Rayo and Quintanar Guerrero 2014).

La purificación por diálisis por difusión a través de una membrana semipermeable se realizó en un recipiente de plástico con aproximadamente 3 litros de agua destilada. La muestra de 50 mL de emulsión de nanopartículas se cerró en una bolsa de diálisis con un tamaño de corte de 12kD a 14kD NMWC y se transfirió a un recipiente de plástico con agua destilada, el agua se cambió durante 5 días dos veces al día.

3.2.5 LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES

a) Liofilización

Se tomaron los 50 mL de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas, se congelaron en viales de vidrio a -4°C , posteriormente se colocaron en el liofilizador por 48h para obtener las muestras completamente secas.

Se pesó el producto liofilizado y se obtuvo el rendimiento total del volumen liofilizado de las diferentes reacciones.

b) Reconstitución

Para la reconstitución del liofilizado, se tomaron 10 mg de los nanogeles en 1mL de agua destilada, y se dejó en agitación constante por 30 min. Obteniendo la emulsión reconstituida, se tomaron 100 μl y se diluyeron en 10 mL de agua destilada y filtrada.

3.2.6 CARGADO DE NANOGELES

Se pesaron 20 mg de nanopartículas y se agregan a 19mL de agua destilada bajo agitación constante por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se prepararon las soluciones que contienen al fármaco pesando 5 mg 5-FU en 1 mL de metanol. La solución alcohólica se dejó en agitación por 24 h a temperatura ambiente.

Para cargar las nanopartículas, se agregó el mL de solución del 5-FU/metanol a los 19 mL de nanopartículas reconstituidas y se dejó en agitación constante por 24 h a temperatura ambiente para evaporar al metanol. La solución obtenida de los pasos anteriores se transfirió a una membrana de diálisis de 12 a 14 KDa. El agua de la diálisis se cambió cada 30 min las primeras dos horas y cada hora las últimas horas. Se dejó dializar un total de 4 h.

3.2.6.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL 5-FU POR UV-VIS (CARGADO)

Se realizó una curva de calibración para el análisis del cargado con 5-FU. Se realizó una solución madre pesando 5mg de 5-FU y se aforó a 10 mL con buffer obteniendo una solución con una concentración 0.5 mg/mL.

Se hicieron diluciones de la solución madre para obtener diferentes concentraciones en la escala de $\mu\text{g/mL}$ de la siguiente manera; se tomó una alícuota de la muestra de un volumen específico mostrado en la tabla 3:

Tabla 3. Volumen de alícuota en μg y concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$ para curva de calibración del cargado de nanogeles con 5-FU

Volumen de la alícuota en μg	Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$
50	2.5
100	5
200	10
300	15
400	20

Se aforó a 10mL con etanol en un matraz aforado al volumen mencionado. Los análisis de la concentración del fármaco se realizaron empleando el espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Coulter DU520) con las siguientes condiciones: En una cubeta de cuarzo paso óptico de luz a 1 cm, con una longitud de onda 267 nm que se obtuvo haciendo un barrido (solución utilizada para el barrido (1 mg/mL). Se programó el equipo para leer a los nm de la longitud de onda obtenida en el barrido realizado en el mismo equipo, posteriormente se insertó el blanco (etanol) y se procedió a leer cada una de las diferentes muestras.

Nota: Las soluciones tienen que ser preparadas en el momento para evitar cualquier degradación del fármaco. Asegurarse de que la solución este bien homogenizada y lavar la cubeta con el blanco cuidando que no queden residuos de la muestra anterior para obtener resultados más precisos.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES

Los nanogeles pueden ser caracterizados por sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, número de distribuciones, cargas superficiales y morfología. Para la rutina del tamaño de partícula, se utilizan comúnmente dos técnicas: Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Difracción de Láser (LD).

La Dispersión de Luz Dinámica o también conocida como Espectroscopia de Fotocorrelación, la cual mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz cuando es dispersada por el movimiento de las partículas(Jia et al. 2023).

La caracterización de los nanogeles se realizó pasando por varias pruebas, inicialmente se leyeron las nanopartículas en solución acuosa en el DLS, haciendo mediciones para analizar su diámetro hidrodinámico, dispersión, potencial zeta y su comportamiento en diferentes pH.

3.3.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

Para determinar el tamaño de partícula se utilizó 1 mL de muestra concentrada o diluida 50:1, tomando 980 μL de agua de grado miliQ y 20 μL de la muestra. El mililitro de la muestra se colocó en una celda transparente para inmediatamente colocar en la rejilla del equipo para analizarla.

Los nanogeles fueron sometidos a variaciones de pH con el objetivo de evaluar su respuesta en términos de diámetro, en función del entorno al que fueron expuestos. La metodología empleada consistió en diluir 20 μL de nanogeles en 980 μL de un tampón

con el pH deseado (3, 5, 7 u 9), seguido por la medición del diámetro mediante el uso de DLS (Dynamic Light Scattering, por sus siglas en inglés).

3.3.2 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ZETA POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

La determinación del potencial Z, se utilizó para predecir la estabilidad de almacenamiento de las dispersiones coloidales. 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(Onugwu et al. 2023). Para determinar el potencial zeta de la emulsión, se utilizó 1 mL de muestra concentrada y diluida en diferentes pHs (3, 5, 7 u 9), tomando 800 μ L de buffer de grado y 200 μ L de la muestra. El mililitro de la muestra se colocó en una celda transparente con electrodos para inmediatamente colocar en la rejilla del equipo para analizarla.

3.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA MICROSCOPIA FE-SEM

Para la caracterización de los nanogeles por su morfología se utilizó la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM), por lo que las muestras se prepararan de la siguiente manera: Se toma 1 mL de la muestra con una concentración al 1% v/v y se afora con agua mili Q a 2.5 mL, esto con la intención de obtener una muestra con la concentración de 4 mg/mL, de esta muestra se tomó 2 μ L con una micropipeta y se colocaron en una rejilla de cobre recubierta con carbón “400 mesh Cu Lacey Carbón” con número de serie 141089 , SPI supplies. El excedente liquido de la muestra se secó con un papel filtro, dando pequeños toques con el papel por la

orilla de rejilla, se agregarán otros 2 μL de la muestra en el mismo lugar donde se depositó la anterior y se secó de la misma manera, se agregó 2 μL por duplicado una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 1% (100 mg en 10 mL de agua destilada) siguiendo el mismo procedimiento se removió el excedente del colorante con el papel filtro. La rejilla ya con la muestra y el colorante, se dejó secar por 48 h en un tubo eppendorf a temperatura ambiente.

3.4 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE 5-FU A PARTIR DE LOS NANOGELES

CARGADOS

Para llevar a cabo la cinética de liberación la metodología consta de dos pasos principales, la curva de calibración del fármaco en los dos diferentes pH y la liberación del fármaco en las condiciones simuladas de un microambiente tumoral y uno de tejido sano.

3.4.1 Curva de calibración de la 5-FU por UV-VIS (pH 5 y 7.4)

Se realizó una curva de calibración para el análisis de la liberación con 5-FU en dos diferentes pH para simular las condiciones del organismo. Se realizó una solución madre pesando 5mg de 5-FU aforado a 10 mL con el buffer filtrado correspondiente para obtener una solución con una concentración 0.5 mg/mL. Se hicieron diluciones de la solución madre para obtener diferentes concentraciones en la escala de $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la siguiente manera, se tomó una alícuota de la muestra de un volumen específico mostrado en la tabla 4:

Tabla 4. Volumen de alícuota en μg y concentración $\mu\text{g/mL}$ para curva de calibración análisis de 5-FU.

Volumen de la alícuota en μg	Concentración $\mu\text{g/mL}$
20	1
50	2.5
100	5
200	10
300	15
400	20

Se aforó a 10 mL con el pH correspondiente (5 o 7.4) en un matraz aforado al volumen mencionado. 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 paso óptico de luz a 1 cm, con una longitud de onda de 267 nm y las soluciones blanco de buffer de fosfatos pH 5 filtrado y buffer de fosfatos pH 7.4 filtrado. Se programó el equipo para leer a una longitud de onda de 267 nm, posteriormente se insertó el blanco correspondiente (buffer pH5 o 7.4) y se procedió a leer cada una de las diferentes muestras.

Nota: Las soluciones tienen que ser preparadas en el momento para evitar cualquier degradación del fármaco. Asegurarse de que la solución este bien homogenizada y lavar la cubeta con el blanco cuidando que no queden residuos de la muestra anterior para obtener resultados más precisos.

3.4.2 LIBERACIÓN DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO (5-FU)

El estudio de la liberación del 5-FU de los nanogeles y el estudio del material control (nanogeles sin cargarse con 5-FU), se realizó mediante diálisis a temperatura de 37 y 42 °C y pHs de 5 y 7.4, de acuerdo a la siguiente manera:

Se colocaron 10.5 mL del buffer correspondiente y se añadió 10.5 mg de nanopartículas cargadas (para tener una concentración de 1mg/mL). La diálisis se colocó contra 105 mL del mismo buffer en un vaso de precipitado en el oscilador, con una temperatura de 37°C o 42°C. Se tomaron alícuotas de 3 mL en intervalos de tiempo previamente establecidos (0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h), reponiendo los 3 mL de alícuota con otros 3 mL de buffer 7.4 por cada muestra tomada. Las muestras se leyeron en UV-Vis a 267 nm, y se calculó el porcentaje (%) de liberación con la curva de calibración para liberación. Porcentaje de liberación de fármaco = (Cantidad liberada / Cantidad total) x 100, ANEXO 6. La liberación se realiza por triplicado para obtener las medias y la desviación estándar.).

3.5 ELECTROHILADO E INCORPORACIÓN DE NANOGELES CARGADOS CON 5-FU A NANOFIBRAS POLIMERICAS BIOADHESIVAS (PVP)

3.5.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES POLIMÉRICAS

En una jeringa plástica (22G) se cargó con la solución de PVP al 50 %, removiendo todas las burbujas formadas durante la carga de la jeringa, dando toques o pequeños golpes a la jeringa para que las burbujas puedan salir a la superficie y no interfieren al momento de electrohilar.

Una solución de poli (vinil pirrolidona) (PVP) al 50% (w/v) se preparó utilizando como solvente agua destilada/metanol en una relación 1:1 preparándose en baño maría a 45°C con agitación constante, hasta su total disolución. Una vez disuelta, se dejó asentar la solución a temperatura ambiente durante toda la noche para remover posibles burbujas. Además, se realizaron mezclas de formulación de la solución polimérica de PVP al 50 % y diferentes porcentajes de nanogeles cargados.

Por otro lado, se preparó una solución de poli (ϵ -caprolactona) (PCL): al 10% (p/v) en metanol/cloroformo en una relación 1:1 preparada en baño maría a 80°C con agitación constante hasta total disolución. Una vez disuelta, se dejó asentar la solución a temperatura ambiente durante toda la noche para remover posibles burbujas.

3.5.2 ELECTROHILADO

Las soluciones poliméricas cargadas al sistema de electrohilado ensamblado en el laboratorio de ingeniería de tejidos y biomateriales (LINTEB) UABC/FCITEC ensamblado por Velasco et al. (Velasco Barraza et al. 2016). Las condiciones de electrohilado para cada solución polimérica se muestran en la siguiente tabla 5:

Tabla 5. Condiciones de electrohilado para cada solución polimérica.

Parametros	PVP	PVP+NG's	PVP+NG's/5-FU	PCL
Voltaje	20kV	20kV	20kV	20kV
Distancia	12-15cm	12-15cm	11-13cm	10-13cm
Flujo	0.36mL/h	0.36mL/h	0.28-30mL/h	0.8mL/h
Humedad	25-43%	25-43%	20-35%	25-38%
Tempertura	20-27°C	20-27°C	20-25°C	20-27°C

La primera capa se produjo a través de la técnica de electrohilado a partir de 1 mL de solución de PVP al 50% (p/v) sobre una lámina de aluminio unida al colector, el andamio cargado con NG's se realizó con la misma técnica y polímero en las mismas proporciones añadiendo aproximadamente 8 mg de NG's a la solución previo a la técnica de electrohilado. Posterior a su electrohilado la primera capa fue recolectada en su totalidad para posteriormente plegarla sobre si misma hasta quedar con una dimensión de 1 cm de ancho por 1 cm de largo.

La segunda capa se electrohiló 1 mL de solución de PCL con una concentración 10% sobre la primera capa plegada.

Posteriormente, todo el sistema fue recolectado en papel encerado con extremo cuidado para posteriormente recortarlo a las mismas dimensiones de la primera capa. Posterior a la obtención del sistema completo, fue medido el grosor de este utilizando un Vernier de acero inoxidable (Blackbolt) calibrado en mm.

3.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS ELECTROHILADAS

La importancia de la caracterización de las nanofibras radica en su capacidad para abrir nuevas posibilidades en una variedad de campos, desde la medicina hasta la nanotecnología. Una comprensión detallada de estas propiedades permite el diseño y la optimización de nanomateriales para aplicaciones específicas, mejorando así su funcionalidad y eficacia(Torres-Martinez et al. 2018).

3.6.1 MICROSCOPIA DE BARRIDO (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscopy) es una técnica poderosa y ampliamente utilizada en la caracterización de nanofibras (Torres-Martínez et al. 2019).

Se realizaron imágenes a través de un microscopio de emisión de campo marca Tescan, modelo VEGA 3SB con un voltaje de 11kV.

3.6.1.2 DIÁMETRO PROMEDIO DE LAS FIBRAS

Se empleó el software Imagen J para medir el diámetro de las fibras. Las imágenes se seleccionaron a una amplificación uniforme de entre las imágenes tomadas, la cual fue de 1,000x para todas las muestras. Se midieron 100 diámetros de diferentes nanofibras para sacar el promedio.

Las imágenes seleccionadas para este ensayo fueron imágenes del SEM. La medición del diámetro en el software incluye seis pasos: 1) se abre la imagen en el software Image J, 2) la herramienta para la medición se selecciona, 3) la escala de la medición debe ser determinada estableciendo una relación entre micrones y píxeles, 4) el diámetro de las fibras es medido, 5) la información obtenida es guardada en un archivo de texto después de que la desviación estándar de los diámetros es evaluada y 6) se determina la distribución. Esta información es graficada en barras con el software Microsoft Excel. Para medir los parámetros, las fibras en la micrografía tienen que estar presentes en el primer plano y deben ser continuas.

3.6.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica y la temperatura de degradación de las membranas fibrosas, se realizaron mediciones de TGA en un analizador termogravimétrico diferencial (SDT) simultáneo de TA Instruments, modelo Q600 V20.9. Se colocaron muestras de diez miligramos de materiales puros y combinados en una bandeja de platino y se recolectaron datos de pérdida de peso, en el rango de temperatura de 20–600°C a una velocidad de calentamiento de 10°C·min⁻¹ en una atmósfera de nitrógeno.

Las fibras fueron evaluadas en el equipo TA instruments SDT Q600 V20 Thermal Gravimetric con una velocidad de calentamiento de 10 °C/ min, en un intervalo de temperatura de 0 °C hasta los 700 °C y en una atmósfera de nitrógeno.

3.6.4 INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Se realizaron análisis de FTIR a través de un espectrómetro FT-IR Nicolet iS10 de Thermo Scientific, de los andamios poliméricos PVP, así como con la incorporación de las nanopartículas y 5-FU con el polímero de liberación (PVP). Los espectros resultantes fueron comparados con bases de datos de espectros poliméricos y tablas de localización, que nos permitan determinar e identificar las bandas características de los grupos funcionales de cada polímero.

3.7 DESARROLLO DE SISTEMA BICAPA BIOCOMPATIBLE CON LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO

Para desarrollar el sistema bicapa se utilizó la técnica de electrohilado, en dos principales pasos:

Paso 1. Se procedió a electrohilar 2 mL de PVP al 50%, enriquecido con un 2% de nanopartículas cargadas con el fármaco 5-FU. Para incorporar las nanopartículas, se adicionó el liofilizado de las mismas directamente a la solución polimérica antes de llevar a cabo el electrohilado. Una vez que este proceso se completó utilizando los parámetros previamente especificados, se permitió reposar la muestra durante 24 horas en la campana de extracción a temperatura ambiente. Esto facilitó la evaporación de los residuos del solvente, asegurándose de no superar las 24 horas para evitar la pérdida de humedad. Posteriormente, la estera resultante se despegó del papel colector y se dobló en cuatro partes, obteniendo así una malla de nanofibras de aproximadamente 2 cm².

Paso 2 La estera de nanofibras se recolocó en un nuevo papel colector aprovechando su adhesión y sobre este se electrohilo 2 mL de PCL, se recolecto el sistema y el PCL excedente. Se plego sobre si mismo para tener un tamaño correspondiente con la estera de PVP, dejando un ligero excedente para más protección de las esteras cargadas.

Este proceso meticuloso de electrohilado en dos pasos permitió la formación de un sistema bicapa, donde se logró la combinación de PVP y PCL en un solo sistema. Esta estrategia de fabricación proporciona un enfoque integral para el desarrollo de sistemas de liberación de medicamentos, aprovechando las propiedades únicas de cada capa para optimizar la eficacia y la protección del compuesto farmacológico.

3. 8 CAPACIDAD BIOADHESIVA CON EL ENSAYO DE FUERZA DE ADHESIÓN

Se realizó una prueba adhesiva evaluando las fuerzas para despegar los tapetes de nanofibras del tejido dérmico. Se utilizó un analizador de textura Brookfield CT3

(Middleboro MA, EE. UU.) equipado con una sonda cilíndrica para llevar a cabo la prueba con una celda de carga de 250 N. Se obtuvieron muestras de tejido cutáneo de abdomen humano. Se cortaron porciones pequeñas (2 cm^2). Las muestras dérmicas se lavaron con solución tampón de fosfato (pH 6,8) a $37 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. El tejido cutáneo se montó en el texturometro Test Fixture TA-MA y se sumergió en tampón de fosfato con agitación constante. Las nanofibras se unieron a una sonda cilíndrica usando una cinta de doble cara. Ambas partes hicieron contacto durante 30 s aplicando una fuerza de 1 N. La sonda se retiró del tejido a una velocidad de 1 mm s^{-1} . Se obtuvieron datos de fuerza de desprendimiento (DF).

3.9 PERMEACIÓN DEL 5-FU A PARTIR DEL SISTEMA TÓPICO

Con el propósito de evaluar la eficacia del sistema bicapa en la liberación del fármaco 5-FU, se llevaron a cabo dos métodos de estudio específicos para analizar la permeación: el método *in-vitro* y el método *ex-vivo*.

En primer lugar, el método *in-vitro* se utilizó para simular las condiciones de liberación del fármaco en un entorno controlado de laboratorio. Este enfoque permitió una evaluación detallada de cómo el sistema bicapa interactúa y libera el 5-FU en condiciones controladas, lo que proporciona datos cruciales sobre su capacidad de liberación.

Por otro lado, se implementó el método *ex-vivo* para estudiar la permeación del fármaco en condiciones más cercanas a la realidad fisiológica. Este método implica la utilización de tejido biológico, como piel o membranas mucosas, para analizar cómo el sistema

bicapa se comporta y libera el fármaco en un entorno más cercano a las condiciones biológicas reales.

Ambos métodos de estudio fueron fundamentales para obtener una comprensión integral de la capacidad del sistema bicapa para liberar el 5-FU. La combinación de datos *in-vitro* y *ex-vivo* proporciona una visión completa de la eficacia del sistema en diferentes contextos, permitiendo una evaluación más precisa de su potencial aplicación clínica.

3.9.1 ESTUDIOS *EX-VIVO* E *IN-VITRO* DE PERMEACION EN CELDAS VERTICALES DE FRANZ DE 5-FLUOROURACILO

Los ensayos de permeación de la piel *ex-vivo* se realizaron usando piel de abdomen humano, como barrera y membrana permeable sintética para los estudios *in-vitro*.

La piel se obtuvo de una clínica estética (adjunto carta de solicitud), proveniente de una cirugía estética, esta se limpió de exceso de grasa inmediatamente con equipo de disección quirúrgico, se llevó a congelación a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, entre dos placas de vidrio. Una vez congelada la piel, se quitó el exceso de tejido adiposo y se limpió con solución salina a temperatura ambiente y se almacenó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El ensayo se realizó en un conjunto de celdas de Franz (celda de difusión Franz con camisa, con volumen de receptor de 7 mL, vidrio transparente). La cámara receptora se llenó con buffer, pH 7,4, y se mantuvo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agitó a 400 rpm durante el ensayo.

Para asegurar la veracidad de los resultados, la permeación *in-vitro* se usó como control donde, se colocó un volumen de 600 μL de solución patrón (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 5-Fluorouracilo libre correspondiente a 300 μg sobre membrana permeable sintética como primer control *in-vitro*.

En la segunda celda se colocaron 30 mg nanogeles cargadas, equivalente a 1 % de 5-Fluorouracilo libre correspondiente a 300 µg sobre membrana permeable sintética como segundo control *in-vitro*.

En la tercera celda, se colocaron 30 mg de nanofibras de PVP con nanogeles, equivalente a 1 % de 5-Fluorouracilo libre correspondiente a 300 µg sobre la membrana sintética *in-vitro*. *Esto se repitió por triplicado*.

El ensayo *ex-vivo* se realizó también por triplicado y en las mismas condiciones anteriormente descritas.

Se colocó un parche de peso 30 mg de nanofibras con nanopartículas cargadas, equivalente a 1 % de 5-Fluorouracilo libre correspondiente a 25 µg sobre membrana. Como control se usó una solución de 5-FU sobre la piel como membrana. La cantidad de 5-FU retenida en la piel se calculó considerando la diferencia entre la cantidad inicial del 5-FU añadida al compartimento donante y la cantidad cuantificada al final del ensayo en el receptor. Cantidad de 5FU en piel = cantidad inicial del 5-FU- cantidad cuantificada al final del ensayo.

3.9.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE 5-FU DE MEMBRANA *EX-VIVO* (PIEL)

Extracción de la piel: Después de los estudios de permeación *ex vivo*, el 5-FU retenido en la piel se extrajo utilizando un proceso de extracción de la piel específico e innovador desarrollado por Praca et al (Viegas et al. 2018) (Figura 11).

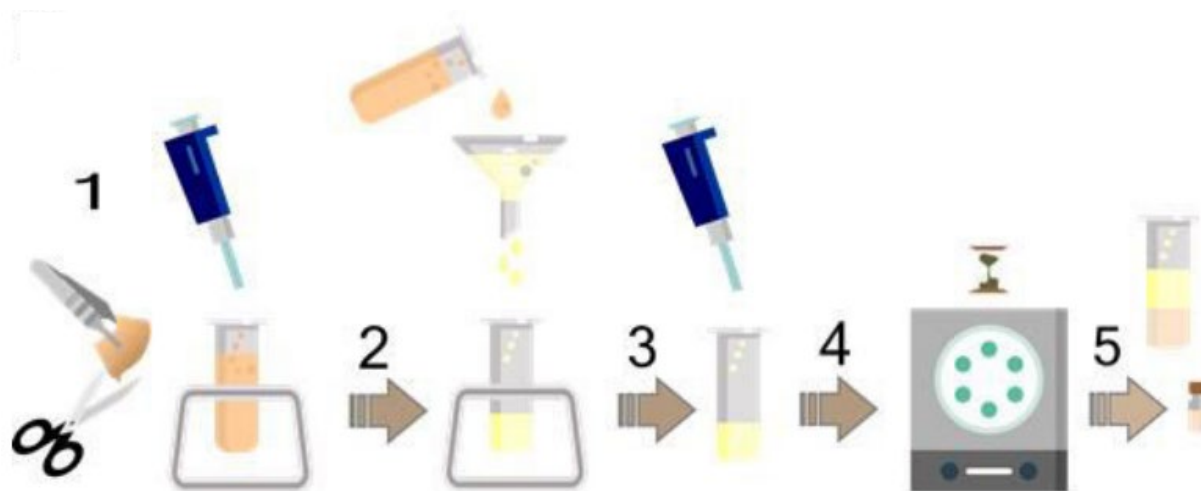


Figura 11. Proceso de extracción de 5-FU de membrana biológica.

1. Preparación de la piel: epidermis, dermis y estrato corneo, se cortó en trozos pequeños y se trituró en un Homogeneizador ultra-turrax con 5 mL de tampón fosfato pH 7,4 durante un minuto.
2. Filtración: La solución homogeneizada se filtró a través de una membrana de 0,45 μm para eliminar partículas no deseadas (Millipore).
3. Eliminación de interferencias: Exactamente 2 mL de solución de acetato de etilo se mezclaron con las sustancias filtradas para eliminar interferencias de la piel.
4. Mezcla adicional: La mezcla se agitó durante 30 segundos.
5. Centrifugación: La muestra se centrifugó a 600 $\times g$ durante 5 minutos para lograr la completa separación de las fases orgánica y acuosa.

Recuperación de la fase acuosa: Se retiró la fase acuosa de la mezcla.

Cuantificación del 5-FU: La cantidad de 5-FU se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.9.3 MÉTODO HPLC-UV PARA LA CUANTIFICACIÓN DE 5-FLUOROURACILO DESPUÉS DE UN ENSAYO DE PERMEACIÓN

Se prepararon soluciones madre de los analitos 5-FU (1 mg/mL) en estándar en agua. Curvas de calibración de 5-FU (5–100 µg/ml), se prepararon soluciones estándar de trabajo a concentraciones de 5, 25, 50, 75 y 100 µg/mL. Para el análisis se llevó a cabo en una columna de cromatografía C8 Phenomenex (100 mm x 4,6 mm, 5 µm, 110A) y detector UV-visible operado a 265 nm. Usando un gradiente de fase móvil compuesta por metanol: Agua (10:90) v/v, acidificada con ácido ortofosfórico al 0,05% (v/v) (pH 4,5). El volumen de inyección fue de 30 µL y el flujo de la fase móvil se optimizó a 0,8 mL por minuto. y la separación se realizó a temperatura ambiente. Se uso para los límites de detección y cuantificación de 0.07 y 0.1 µg/mL respectivamente.

3.10 CITOTOXICIDAD CELULAR

Para realizar los experimentos *in vitro* con líneas celulares, se utilizó el método del MTT; Este método evalúa la capacidad de las células para convertir las sales de tetrazolio al colorante formazán, por medio de la enzima succinato reductasa; la cual es una enzima mitocondrial que es activa en células viables. El aumento de formazán es proporcional al número de células vivas metabólicamente activas (Bálintová, Matúšková, and Gábelová 2022).

Para comenzar con el cultivo celular, se obtuvieron 3 muestras de las nanofibras de diferentes preparaciones de nanofibras de PVP:

- A. PVP con 1% de nanogeles.
- B. PVP con 1% de nanogeles cargados con 5-FU
- C. PVP con 5-FU (equivalente a la cantidad correspondiente en las nanofibras B)

CONTROLES:

C+, control positivo (fármaco)

C-, control negativo (células)

Se prepararon tres diferentes diluciones de concentración 1 mg/mL con las nanofibras de las mismas formulaciones y el control con 5-FU.

Se cultivaron en monocapa células de melanoma B16F10 (ATCC CRL-6475), en placa de cultivo de 96 pocillos donde se colocaron 5000 células de B16F10 (ATCC CRL-6475) por pocillo (Thermo SCIENTIFIC, *Nunclon*TM delta Surface, Denmark), Se utilizó medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de l-glutamina, y 1% de una mezcla de penicilina (100 µL/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Las células fueron cultivadas en una atmosfera humificada manteniéndolas en incubación con una mezcla de aire: CO₂/O₂ de 95:5 (%) y temperatura controlada a 37°C. Y se dejaron incubar por 24 h. Se cambió el medio de cultivo y se repitió este último paso 4 h después. Se utilizó el kit MTT (Roche, Suiza) para cuantificar la proliferación celular.

Tratamiento de células con nanofibras:

De esta manera, se administraron volúmenes iguales a los cultivos celulares. La cantidad total de nanofibras (1 mg) fue disuelto en 1mL de medio de cultivo (concentración

1mg/mL) y se adiciono 100 µL de medio de cultivo DMEM. Se dejaron incubando en las condiciones antes mencionadas por 24 h.

Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo después de 48 h de acuerdo con el método de Mosmann (1983) (Amini et al. 2020). Después de la exposición celular a los diferentes tratamientos en estudio, la viabilidad celular fue evaluada mediante el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); Se retiró el medio con el material de todos los pocillos y se adicionó una mezcla de medio fresco y MTT (concentración 0.5mg/mL) en cada pocillo y se incubaron por 4 h, transcurrido el tiempo de incubación se agregó 100uL de buffer de solubilidad y se incubó toda la noche (de 8h a 12H) y se realizó la lectura espectrofotométrica a 620 nm (Lector de microplacas) (Figura 12). Se obtuvieron las absorbancias para realizar los cálculos correspondientes utilizando la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular = \frac{ABS(muestra)}{ABS\ prom\ (celulas\ vivas) - ABS\ prom\ (medio\ de\ cultivo)} \times 100$$

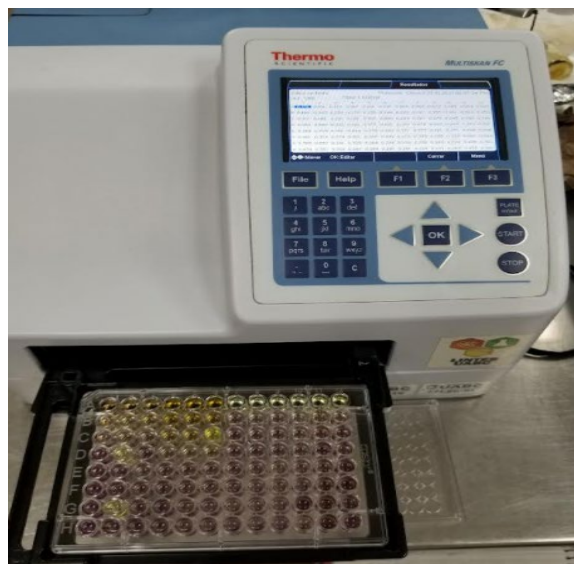


Figura 12. Lector de placas Thermo Fisher Scientific-ES.

3.11 SINERGISMO ENTRE NANOGELLES Y FÁRMACO

El sinergismo se refiere a la interacción de dos o más elementos, agentes o factores que, al trabajar juntos, producen un efecto total que es mayor que la suma de sus efectos individuales (Budman et al. 2012). En otras palabras, en un proceso sinérgico, la colaboración de varios elementos produce un resultado más potente o eficiente de lo que se esperaría si cada elemento actuara de forma independiente.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1 SÍNTESIS DE NANOGELES CATIONICOS DE METACRILATO DE N,N-DIETILAMINOETILO (DEAEM)

Se realizaron múltiples síntesis basadas en los antecedentes encontrados en la literatura Guevara (Manzanares-Guevara et al. 2020), estas se realizaron con dos diferentes entrecruzantes DVA y EGDMA de las cuales se obtuvieron los datos necesarios para la obtención de las condiciones necesarias para la síntesis de NGs. Los parámetros y variables utilizados se muestran en la tabla 6:

Tiempo síntesis (h)	Solvente H ₂ O	Iniciador %	Adición Iniciador	Estado Iniciador
0.5	50mL	/	/	/
0.75	50g	2	En solución	Solución acuosa
1			0min	
1.5	45g	3	10min	Solución atmosfera N ₂
2				
4	45ml	4	30min	Sólido
24				

Tabla 6. Variables para la optimización del método de síntesis de nanogeles.

Los NGs fueron sintetizados por el método de emulsión, en donde se usó como entrecruzante 5 % de DVA las cuales mostraron un tamaño promedio de 129 nm con PDI de 0.184, sin embargo, después de ser dializadas para su purificación presentaron inestabilidad, como se muestra en la figura 13:

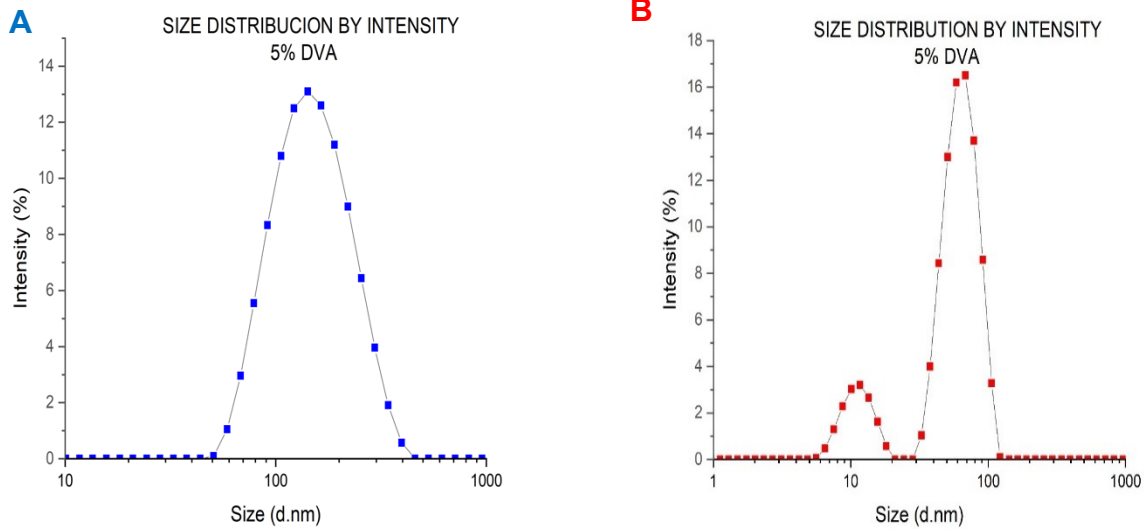


Figura 13. Gráfica de distribución de tamaños de NG's entrecruzados con DVA antes de ser purificados, presentando buena calidad de lectura (A), gráfica de distribución de tamaños de NG's entrecruzados con DVA después de ser purificados, presentando error en la calidad de lectura (B).

Por tal motivo se determinó que las condiciones favorables para poder desarrollar NG's estables y reproducibles, incluía usar como entrecruzante EGDMA al 5%, 50 mL de H₂O y 2% de iniciador AIBA en solución acuosa con la mezcla inicial a temperatura ambiente y antes de ser purgada.

Los NG's sintetizados en solución acuosa presentaron un color típico de las emulsiones coloidales entre blanco y azul transparente, esto debido al fenómeno conocido como interferencia de película delgada, fenómeno óptico que ocurre cuando la luz interactúa con una película delgada de un material transparente o semitransparente, asociada con la dispersión de la luz a través de capas delgadas y estructuras específicas en la superficie de ciertos materiales, lo que causa efectos ópticos interesantes en emulsiones, especialmente aquellas que involucran capas delgadas o estructuras microscópicas que pueden interactuar con la luz de manera específica. Por ejemplo, en

ciertos sistemas coloidales o emulsiones ópticas, podrías encontrar fenómenos como la interferencia de la luz que podría dar lugar a colores perceptibles. El cambio en el color puede indicar cambios en la distribución o tamaño de las partículas coloidales (figura 14).

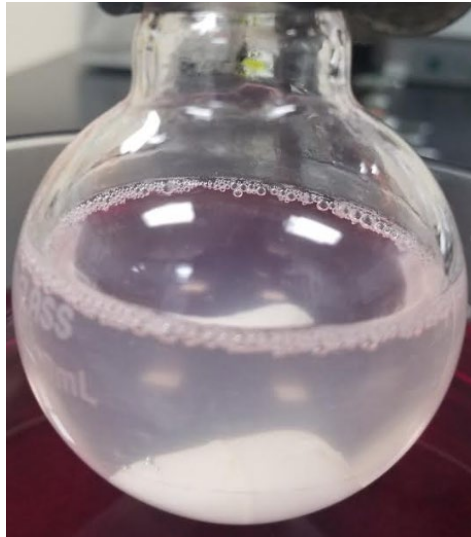


Figura 14. Nanogeles en solución.

Posterior a la síntesis y purificación de los nanogeles, se procedió a liofilizar el material. Se obtuvieron las emulsiones liofilizadas y se observaron con las características de un material blanco esponjoso, sin rastros de humedad.

Los nanogeles liofilizados presentan color blanco y estructura parecido a las fibras de algodón (Figura 15).



Figura 15. Nanogeles en liofilizados.

El rendimiento obtenido después de ser dializadas y liofilizadas por 48 h fue de 33.6%.

El material liofilizado se reconstituyó en agua destilada (1 mg/ml). Se obtuvo una emulsión jabonosa, transparente de un color azul claro. Se confirmó la estabilidad de los nanogeles al proceso de liofilizado (Figura 16).

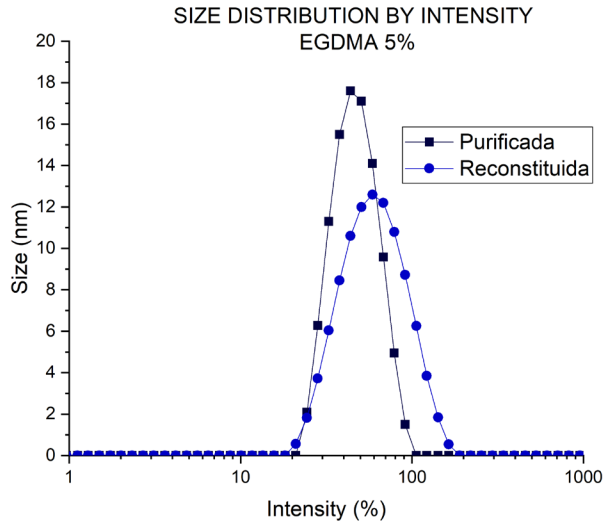


Figura 16. Gráfica de distribución de tamaños de NG's entrecruzados con EGDMA antes de ser purificados y después de ser liofilizados y reconstituidos.

4.1.2 CARGADO DE NANOGELES CATIÓNICOS DE METACRILATO DE N,N-DIETILAMINOETILO (DEAEM) CON 5-FU

Para determinar la eficiencia de encapsulación (%EE) y la eficiencia de carga (%LE), en primer lugar, se realizó la curva estándar de 5-FU. Con los datos obtenidos de la curva para cargado, se realizaron los cálculos requeridos para determinar la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación ANEXO 6. La ecuación estándar de absorbancia (y) y concentración (x) de 5-FU fue $y = 0.0499x - 0.018$ y el coeficiente de correlación R^2 fue 0,9989, lo que indica que había una buena relación lineal entre la

concentración de 5-FU y el valor de absorbancia en el rango de 0 a 50 µg/mL, las ecuaciones utilizadas para calcular %EE y %LE son las siguientes:

$$\%EE = \left(\frac{\text{weight 5-FU}(\mu\text{g})}{\text{Theoretical drug loading}} \right) \times 100$$

$$\%EL = \left(\frac{\text{weight 5-FU}(\mu\text{g})}{\text{Total weight of delivery system}} \right) \times 100$$

Donde se obtuvo un %EE de 37.86% y un %EL de 10.42%. Para tener 1mg de fármaco en la muestra se utilizaron 10.42mg de nanogeles.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS, DIÁMETRO HIDRODINAMICO

Los resultados obtenidos con el método optimizado para la síntesis de NG's dio como resultado NG's catiónicos con tamaño promedio de 70nm con una desviación estándar ± 17 y un PDI de 0.24 y presentando una sola distribución de tamaños. A continuación, se muestra una gráfica de la distribución de tamaños (Figura 17):

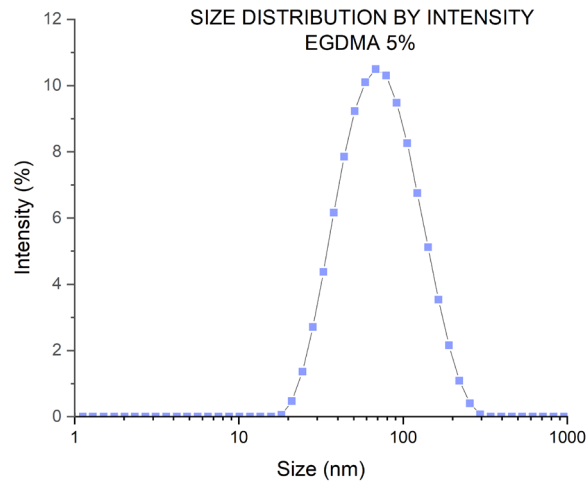


Figura 17. Gráfica de distribución de tamaños de los NG's usados en el TDDS.

4.2.1 EFECTO DEL PH EN EL DIÁMETRO HIDRODINAMICO DE LOS NANOGELESS

La funcionalidad de los nanogeles sensibles al pH se fundamenta en su capacidad para experimentar cambios de expansión o contracción, los cuales son inducidos por la protonación o deprotonación de grupos aniónicos o catiónicos que conforman la estructura de red polimérica (Hayashi et al. 2004). La molécula de DEAEM presenta grupos de cadena lateral ionizables, específicamente $-N(CH_3)_2$, los cuales pueden adquirir carga mediante la acidificación de la solución (Hayashi et al. 2004; Sherly, MR, and V.S. 2020).

Para analizar la respuesta de los nanogeles a las variaciones de pH, se midieron los diámetros hidrodinámicos promedio finales de las partículas de nanogel dializadas y liofilizadas a diferentes pH a 25 °C mediante DLS, como se muestra en la tabla 7.

La Figura 18 presenta el diámetro hidrodinámico en función del pH para los nanogeles dispersos en un medio tamponado a diferentes pH. El punto de inflexión de la curva de diámetro hidrodinámico versus pH muestra la transición del volumen de fase desde un

estado hinchado hasta un estado colapsado a pH 5 dentro del rango de volumen de transición de fase por pH encontrado en la literatura para nanogeles basados en DEAEM. Además, el DEAEM presenta una capacidad tampón que dependiendo del método de síntesis utilizado puede variar, colocando al homopolímero con un pKa en el rango 7–7.5 mientras los nanogeles basados en este homopolímero presenta un VPTpH en el rango de pH fisiológicamente relevante de 5.0 a 7.4 y se hincha en condiciones ácidas. Pikabea et al. demostró en su trabajo que la constante de acidez para los segmentos de DEAEM podía estimarse a partir del pH en el punto de media neutralización ($\alpha = 0.5$) como pKa 6.23, que es menor que el del homopolímero de DEAEM (pKa 7–7.5), explicando que podría deberse a la alta densidad de cadena local de las secuencias de DEAEM dentro de las partículas de nanogel, lo que hace que la protonación sea más difícil. En este trabajo, el colapso de los nanogeles se muestra a pH 5, lo que sugiere podría deberse a la adición del tensoactivo, siguiendo el principio anterior donde la densidad de cadena se estima aún mayor.

Las partículas de nanogel basadas en DEAEM y entrecruzadas con EGDMA, desarrolladas por Pikabea et al (Pikabea, Ramos, and Forcada 2014); obtuvieron este punto a pH 6.5. Marek y cols. (Marek, Conn, and Peppas 2010) y Hayashi et al. (Hayashi et al. 2004) también observaron una sensibilidad al pH similar en hidrogeles de nanopartículas basados en DEAEM y monometacrilato de poli(etilenglicol)-N-monometil éter reticulado con dimetacrilato de tetraetilenglicol (TEGDMA), y en nanogeles basados en DEAEM que poseen cadenas heterotelequéricas unidas con PEG entrecruzadas con EGDMA, respectivamente. Por debajo del VPTpH, las partículas de nanogel estaban muy hinchadas debido a la protonación de los grupos amina, lo que provocaba la repulsión

de cargas en la red del polímero. Por encima de ese pH crítico, las partículas se encogían, reduciendo su tamaño debido a la deprotonación de los grupos amina y la debilitada repulsión electrostática.

Tabla 7. Cambio de tamaño de los NG's en diferentes pH

pH	Dh (nm)
1.2	115
3	76
4	74
5	62
6	68
6.8	72
7	74
7.4	74
8	76

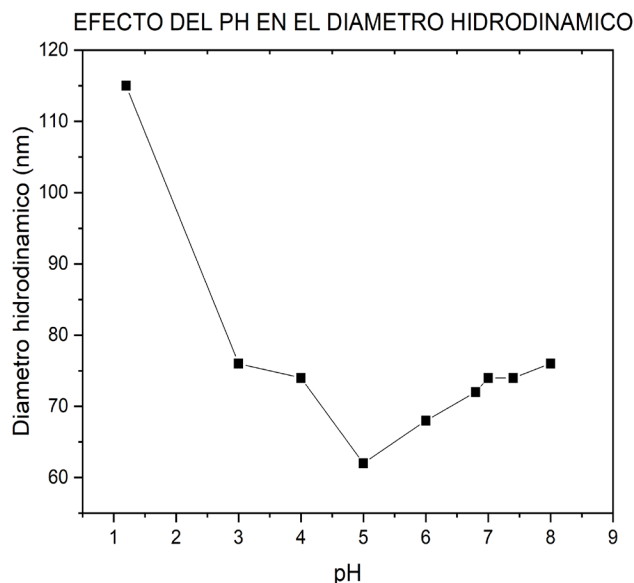


Figura 18. Efecto del pH en el Dh.

4.2.2 EFECTO DEL PH EN EL POTENCIAL ζ DE LOS NANOGELESS

Se obtuvieron nanogeles que contienen grupos amino. Debido a que los nanogeles están compuesto por un monómero que contiene estos grupos, el potencial z en la región ácida tiene una positividad mayor, como se muestra en la gráfica (figura 19) que ilustra el potencial z del nanogel variando con el pH del medio, donde se observa una disminución a pH 5 para volver a aumentar, mientras se percibe esta disminución más constante en el potencial alrededor de un pH de 7, indicando el pKa de PDEAEM, que es de 7.5.

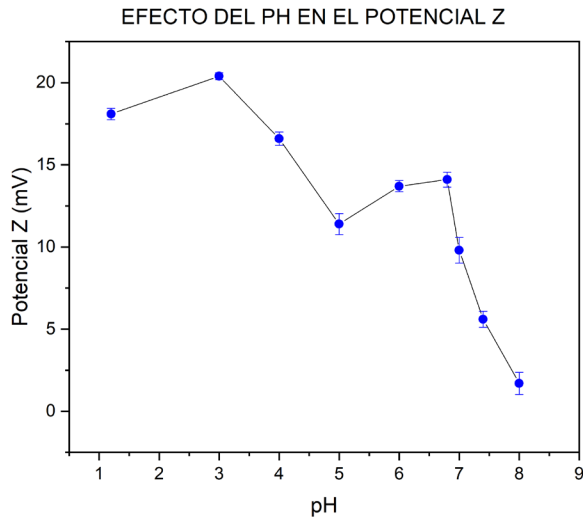


Figura 19. Efecto del pH en el potencial ζ .

El potencial zeta aparente (ζ) disminuye significativamente con el aumento del pH, posiblemente debido a la protonación de grupos de amina terciaria (implicados en las cadenas principales de DEAEM) por medios ácidos. En consecuencia, ζ muestra altos valores positivos a bajos valores de pH y viceversa. Este comportamiento de respuesta al pH es consistente con otros nanogeles basados en PDEAEM informados en la literatura, por ejemplo en el trabajo de Manzanares et al donde realizaron nanogeles de DEAEM con PEGMA presentando potenciales ζ positivos de rangos similares a los presentados en este trabajo (Manzanares-Guevara, Licea-Claverie, and Paraguay-Delgado 2018). Los valores del potencial ζ son totalmente coherentes con el comportamiento esperado de los nanogeles, respaldando la naturaleza catiónica de PDEAEM a valores de pH de interés biológico. Además, se observa que los valores del potencial ζ aumentan con el incremento en el grado de ionización del PDEAEM ante una disminución del pH en el medio.

4.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FE-SEM)

Con el fin de examinar la morfología y tamaño de los nanogeles, se capturaron imágenes mediante microscopía FE-SEM, como se ilustra en la Figura 20A. La imagen en la Figura 20B a muestra una microscopía sin contraste, donde las áreas oscuras revelan agregados de nanogeles, mientras que en la Figura b se presenta una imagen de la microscopía de una muestra preparada con ácido fosfotungsténico. La morfología de los nanogeles en ambas imágenes es difusa, y debido a la imprecisión, la morfología permanece ambigua.

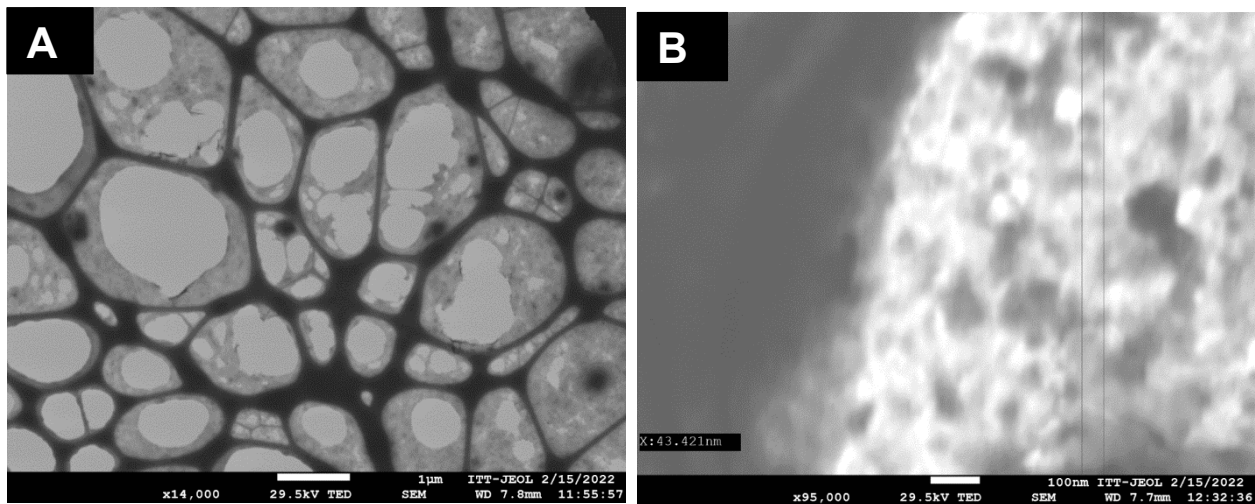


Figura 20. Microscopia FE-SEM de NG's de PDEAEM sin contraste (A), Microscopia FE-SEM de NG's de PDEAEM con contraste(B).

Esta ambigüedad puede explicarse considerando estudios previos que demuestran que los polímeros PDEAEM tienen bajas temperaturas de transición vítrea, lo que representa un desafío para obtener imágenes nítidas(Cornejo-Bravo and Siegel 1996). Investigaciones indican que el PDEAEM desprotonado tiene una T_g inferior a la temperatura ambiente, mientras que el PDEAEM protonado tiene una T_g ligeramente

mayor(Cornejo-Bravo and Siegel 1996). Como resultado, el PDEAEM desprotonado tiende a ser gomoso y es probable que se deforme durante la preparación de la muestra, fusionándose en una película, lo que dificulta, si no imposibilita, la obtención de imágenes claras de partículas individuales. En contraste, el PDEAEM protonado presenta una Tg más elevada, confiriéndole una naturaleza vítrea a temperatura ambiente. Esta característica permite obtener imágenes de mayor calidad, aunque a expensas de la relevante naturaleza higroscópica del polímero. Estas observaciones coinciden con resultados previos que también señalan la dificultad para evitar la formación de películas de látex de PDEAEM durante el proceso de preparación de la muestra(Amalvy et al. 2004). Cornejo-Bravo y Siegel cuantificaron la naturaleza higroscópica del PDEAEM seco y deprotonado midiendo la cantidad de vapor de agua absorbido del aire. En este caso, el peso del polímero se duplicó y el agua actuó como agente plastificante (Cornejo-Bravo and Siegel 1996).

4.3 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE 5-FU A PARTIR DE LOS NANOGELES

CARGADOS

Se realizó la cinética de liberación por triplicado por cada simulación *in-vitro* de microambiente: tejido sano a pH 7.4 a 37°C y tejido patológico pH 5 a 42°C. Para cuantificar la cantidad de fármaco (5-FU) liberado con respecto a la absorbancia se utilizó la curva de calibración mostrada en el ANEXO 3, los datos obtenidos se transformaron para obtener la fracción liberada, mediante el cálculo de la siguiente ecuación:

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

Fracción liberada M_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t , M^∞ es la cantidad total de fármaco en los nanogeles.

La liberación se llevó a cabo por 36 h. Para hacer una comparativa más clara y observar un mejor contraste entre la liberación en el microambiente tumoral y el sano. En la figura 21 se ilustra la gráfica de la liberación de 5-FU, fracción liberada vs tiempo, hasta las 4 h, tiempo en donde se liberó la mayor cantidad del fármaco total. La gráfica nos muestra a las 0.25 h que hay una fracción liberada de 5-FU de aproximadamente 0.5 de fármaco libre tanto a pH 7.4 a 37°C y pH 5 a 42 °C, semejante a la fracción liberada por los nanogeles en la simulación de condiciones de microambiente tumoral. Sin embargo, los nanogeles en condiciones de microambiente sano a las 0.25 h presentan la una fracción liberada cerca de 0.25 (línea negra). En general se observa una liberación más acelerada del fármaco libre contra el fármaco presente en las nanogeles, quedando por debajo en las primeras dos horas de liberación la fracción liberada de los nanogeles en un microambiente sano.

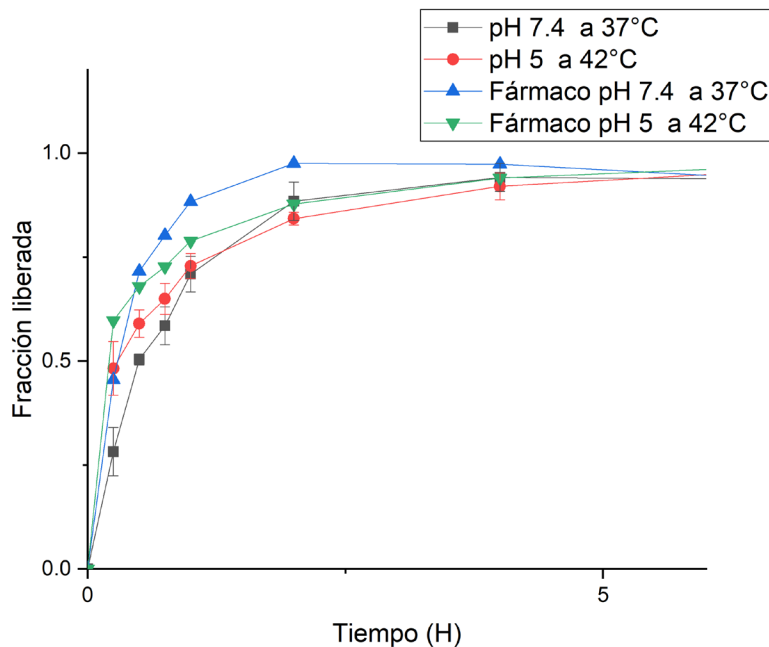


Figura 21. Cinética de liberación de las nanofibras a partir de los NG's.

4.4 ELECTROHILADO

Las nanofibras se recolectaron poniendo papel encerado en el colector en lugar de aluminio, debido a que quedaban muy adheridas al aluminio dificultando la obtención de las esteras de nanofibras en una sola pieza. Las esteras de las nanofibras recolectadas del papel encerado además presentaban mayor uniformidad en sus dimensiones y forma macroscópica. La tabla 8 siguiente presenta una comparación de los diámetros promedios de las nanofibras:

Tabla 8. Tamaño promedio del diámetro de las nanofibras.

	DIAMETRO (nm)		
	PCL	PVP	PVP+NG's
Promedio	1,442	544	534
DE	± 415	± 185	± 210
Min	703	176	198
Max	3,367	1,331	1,214

El PCL presenta un diámetro de fibra mayor al de lo informado en trabajos donde se usan esteras puras, estas muestran diámetros mucho menores, aproximados de 383 ± 89 (J. Wang et al. 2018), sin embargo en estudios como el de Katsogiannis (Katsogiannis, Kontastino Alexandros, Vladislavljević, G.T., Georgiadou 2015) se obtuvieron diámetros similares a los obtenidos en este trabajo esto debido a que las nanofibras han sido incorporadas a un sistema multicapa, sin embargo el mayor tamaño presentado en los diámetros de PCL es conveniente ya que al ser usada como capa de respaldo se espera que brinde protección a la capa de liberación de fármaco. Para la capa de liberación de fármaco se utilizó el PVP que en comparación con la literatura presenta diámetros similares a los obtenidos en este trabajo, Tuğcu-Demiröz et al. menciona que en

comparación con otros trabajos donde se incorporaron nanopartículas cargadas y el diámetro de las nanofibras disminuye, en sus experimentos de nanofibras de PVP con nanopartículas de quitosano se tuvo un impacto negativo debido al proceso de incorporación de nanopartículas en la formación uniforme de fibras. Atribuyendo la causa del incremento en el diámetro promedio de las fibras a la reducción en la conductividad de las soluciones poliméricas, ya que existe una relación directa entre la conductividad de estas soluciones y el diámetro promedio de las fibras (Tuğcu-Demiröz et al. 2021). En el presente estudio se realizaron pruebas con diferentes porcentajes de nanogeles cargados incorporados a la nanofibras y nanogeles sin cargar, el porcentaje mayor de incorporación de los nanogeles sin fármaco fue de 3%, mientras el de nanogeles cargados de 5-FU fue de 1%. Entre la muestra control de nanofibras de PVP y nanofibras de PVP con incorporación del 1% de nanogeles cargados los diámetros de las fibras se perciben similares, esto quiere decir que la incorporación de 1 % de nanogeles cargados con 5-FU a las nanofibras no modifica el tamaño de diámetro de estas. Sin embargo, si se puede ver el impacto negativo en la formación de bulbos observados en las micrografías a continuación.

4.4.1 MORFOLOGÍA NANOFIBRAS MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La micrografía obtenida por SEM de la capa “backing” donde se observan fibras Electrohiladas de PCL, se observan fibras de diámetros irregulares sin llegar a formar bulbos a lo largo de todas las fibras, algunas otras se muestran fusionadas entre sí en el andamio deconformado en su totalidad de PCL, esto debido a la presencia de la capa anterior que puede estar interfiriendo en el campo eléctrico entre la punta de la aguja y placa recolectora acorde a descrito por Katsogiannis, K. A. G. et al 2015.

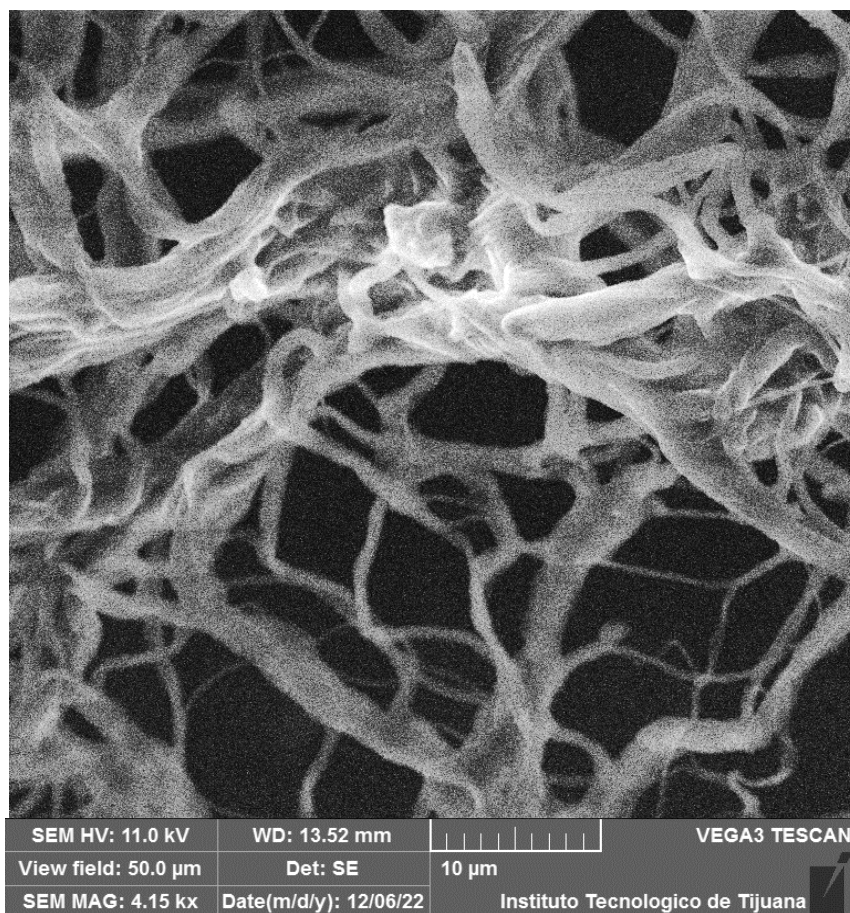


Figura 22. Microscopia SEM de andamio de nanofibras electrohiladas de PCL.

Mientras que no hubo gran diferencia en los datos recolectados referente a los diámetros de las nanofibras de PVP puras y PVP con 1% de nanogeles cargados, en las micrografías SEM dio como resultado una diferencia evidente, donde las fibras de PVP control no presentan bulbos y a lo largo de la fibra se observa que tiene una cierta regularidad (figura 23a), por otro lado, la capa de liberación compuesta por PVP que incorpora los nanogeles cargados de fármaco muestra bulbos en algunas de sus fibras, aunque se nota regularidad en las fibras que no se ven afectadas por los bulbos (figura 23b), esto se puede deber a que los nanogeles incorporaron repercutieron en el momento del desarrollo de las fibras. La figura 24 muestra un acercamiento de uno de los bulbos presentes en la micrografía de PVP con nanogeles integrados.

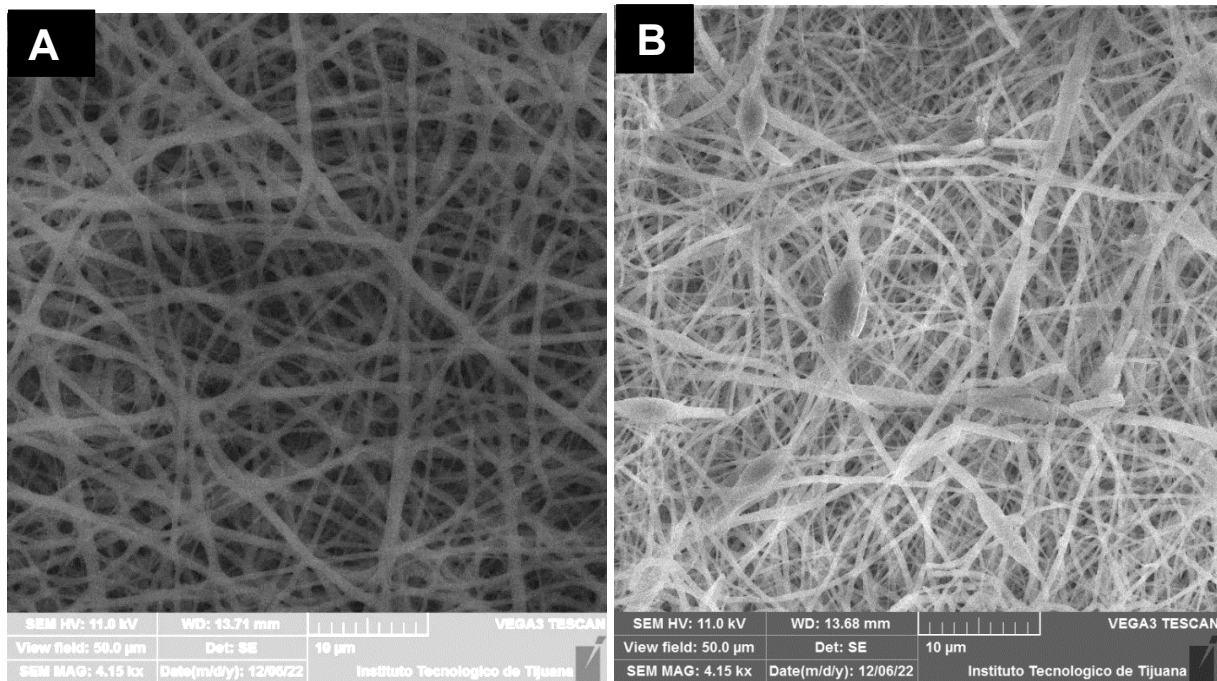


Figura 23. Microscopia SEM de andamio de nanofibras electrohiladas de PVP (A) Microscopia SEM de andamio de nanofibras electrohiladas de PVP con NG's incorporados (B).

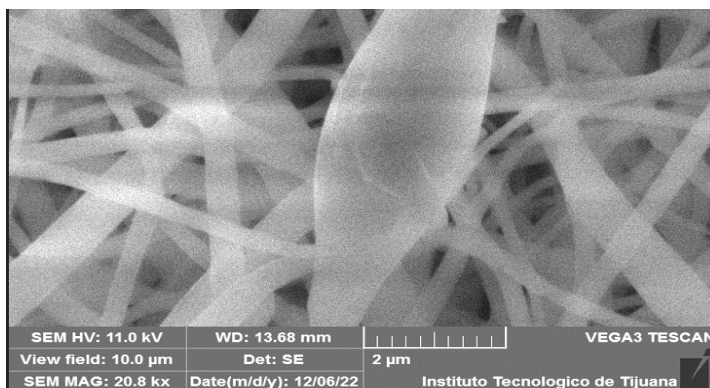


Figura 24. Microscopia SEM de uno de los bulbos del andamio de nanofibras electrohiladas de PVP con NG's incorporados.

4.4.2 INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Los espectros obtenidos fueron cotejados con bancos de datos que albergan espectros análogos a los de las muestras y registros de tablas de referencia que facilitan la determinación e identificación de los grupos funcionales de interés. Se llevó a cabo el análisis de los espectros infrarrojos FT-IR de los grupos funcionales presentes en los polímeros utilizados y en el fármaco 5-FU, utilizando bases de datos para comparar y establecer similitudes.

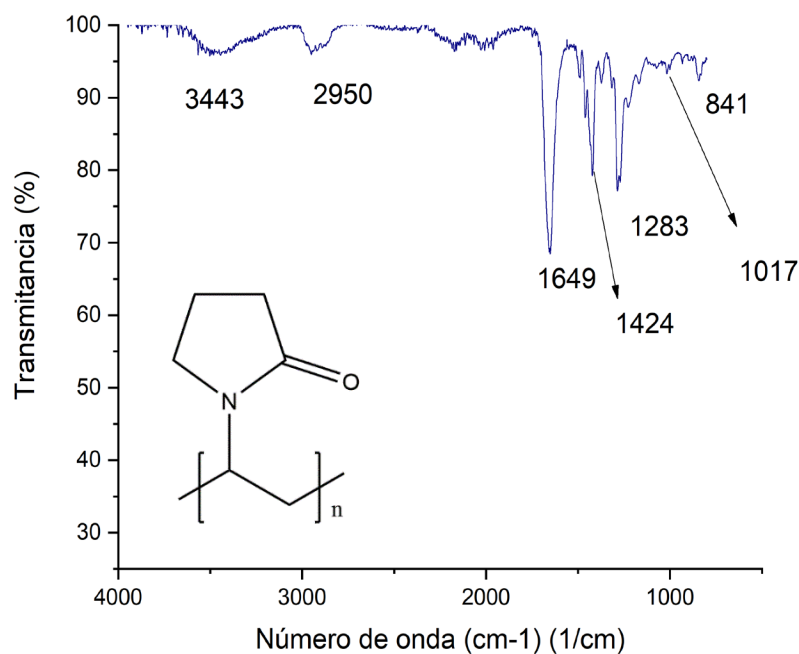


Figura 25. Espectro FT-IR y estructura de PVP.

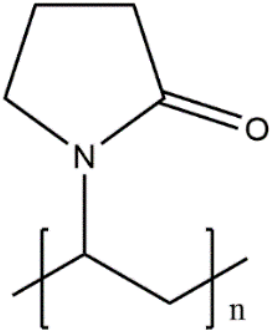
Estructura	Tipo de vibración	FT-IR (cm ⁻¹)
	v(O-H)	3443
	Asymmetric v(CH ₂) of pyrrole ring	2950
	v(C=O)	1649
	δ(C-H)	1424
	CH ₂ wagging v(C-N)	1283
	CH ₂ ROCK	1017
	δ(CH ₂)	841

Tabla 9. Estructura y bandas identificadas en el espectro FT-IR de PVP.

El espectro FTIR de PVP tuvo una banda a 3443 cm⁻¹ que indica estiramiento O-H. La banda a 2950cm⁻¹ demostró la existencia de estiramiento asimétrico de CH₂ del anillo de pirrolico, mientras que el estiramiento de C=O se observó en la banda 1649 cm⁻¹, tensión característica producida por el doble enlace de la molécula de PVP. La flexión C-H y el movimiento del CH₂ se observaron a 1424 cm⁻¹ y 1283 cm⁻¹ respectivamente (Rahma et al. 2016). El estiramiento de C-N a 1283 cm⁻¹. Las bandas a 1017 cm⁻¹ se identificaron como tipo de vibración “rock” del CH₂ y a 841 cm⁻¹ la vibración de CH₂, esto se puede observar en la figura 25, (tabla 9).

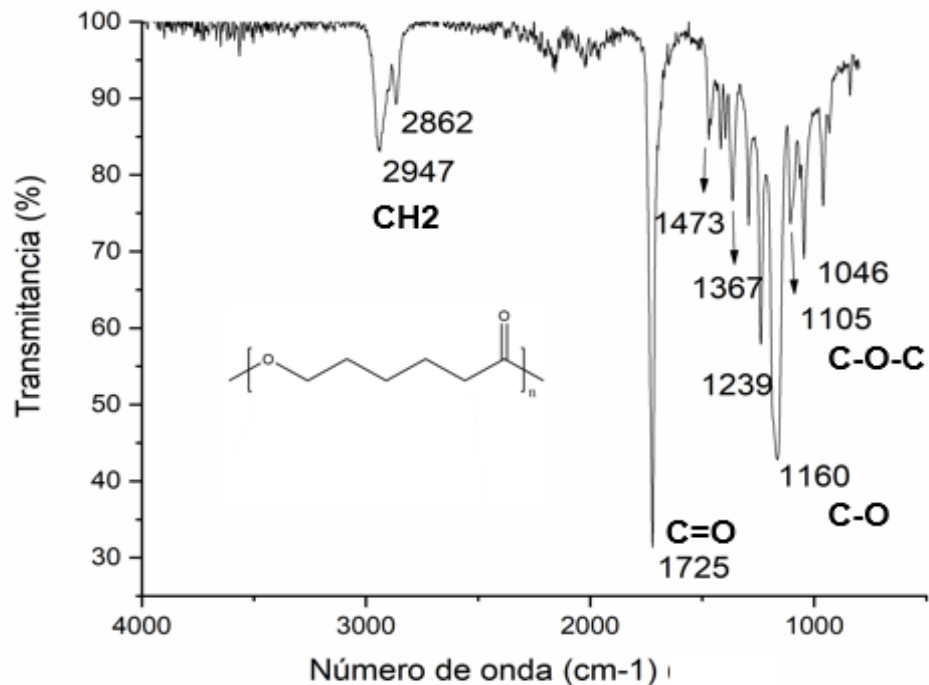


Figura 26. Espectro FT-IR y estructura de PCL.

Tabla 10. Estructura y bandas identificadas en el espectro FT-IR de PCL.

Estructura	Tipo de vibración	FT-IR (cm ⁻¹)
	CH ₂	2942, 2862
	C=O estiramiento	1726
	CH ₂ flexión	1473, 1397, 1361
	C-O-C estiramiento	1233, 1107, 1042
	C-c estiramiento	1290
	C-O-C estiramiento	1160

El espectro PCL muestra las señales características de vibraciones de estiramiento C=O a 1726 cm⁻¹, modos de flexión CH₂ a 1361, 1397 y 1473 cm⁻¹ y estiramiento asimétrico CH₂ a 2942 cm⁻¹ y estiramiento simétrico a 2862 cm⁻¹. Las vibraciones de

estiramiento C—O—C producen señales en 1042, 1107 y 1233 cm^{-1} . Las bandas de 1160 y 1290 cm^{-1} se asignan a los estiramientos C—O y C—C en las fases amorfa y cristalina, respectivamente. Como se muestra en la Figura 26; esta es la banda de estiramiento C—H. El estiramiento típico de C—H generalmente se presenta como una banda distintivamente grande por encima de 3000 cm^{-1} , en este caso presentándose a los 1160 cm^{-1} . (Abdelrazek et al. 2016) Tabla 10.

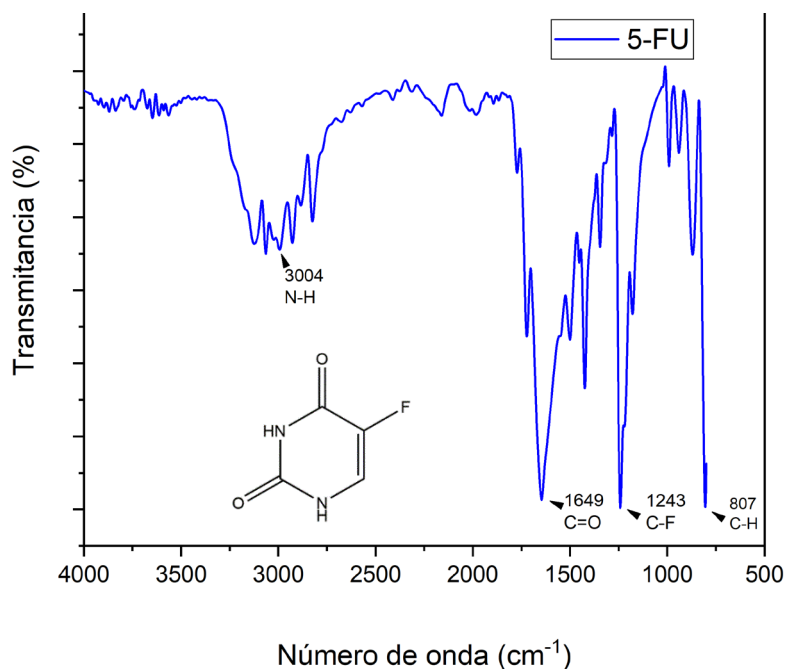


Figura 27. Espectro FT-IR y estructura de 5-FU.

Tabla 11. Estructura y bandas identificadas en el espectro FT-IR de 5-FU.

Estructura	Tipo de vibración	FT-IR (cm^{-1})
	N-H	3004
	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1649
	C-F	1243
	Asymmetric $\nu(\text{C}-\text{H})$ of pyrrole	807

Las bandas principales para 5-FU se observan en la figura 27, son una banda amplia de 3350 a 2880 cm^{-1} que está relacionado con la vibración de estiramiento N-H, una señal distintiva a 1649 cm^{-1} que muestra la vibración de estiramiento de C=O y una señal a 1243 cm^{-1} que coincide con el estiramiento del enlace C-F. Las bandas en la región de la huella dactilar se deben a las vibraciones del anillo de pirimidina sustituido (807 cm^{-1}). (Akalin, Akyuz, and Akyuz 2007) (tabla 11).

Se hizo una comparación de los espectros FT-IR de los materiales que componen la capa de liberación (figura 28). Donde se pueden observar las principales bandas del monómero utilizado en los nanogeles, el monómero de las nanofibras y el fármaco. Comprobando su presencia la en el la capa de liberación (espectro de línea negra). El espectro de la capa de liberación tiene la mezcla de las principales bandas de la huella dactilar propia de 5-FU, DEAEM y PVP (Obu et al. 2021; Patel, Patel, and Jani 2011).

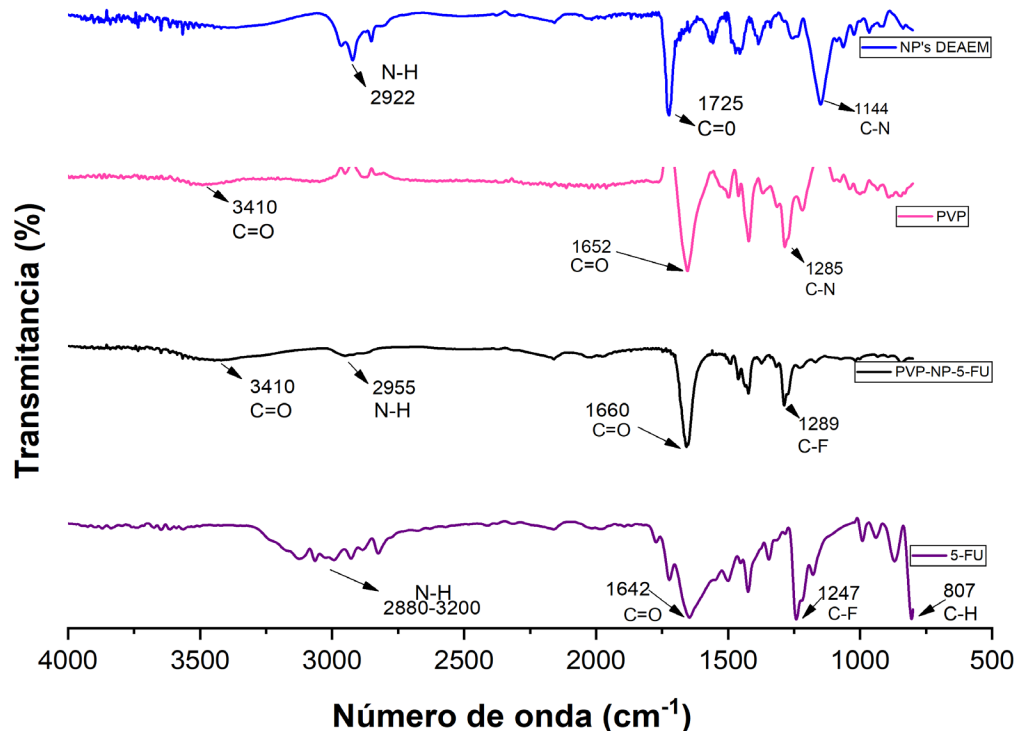


Figura 28. Comparación de los espectros que componen la capa de liberación de las nanofibras. Espectro FT-IR de DEAEM, PVP, 5-FU y la combinación de los 3 en la capa de liberación .

4.4.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

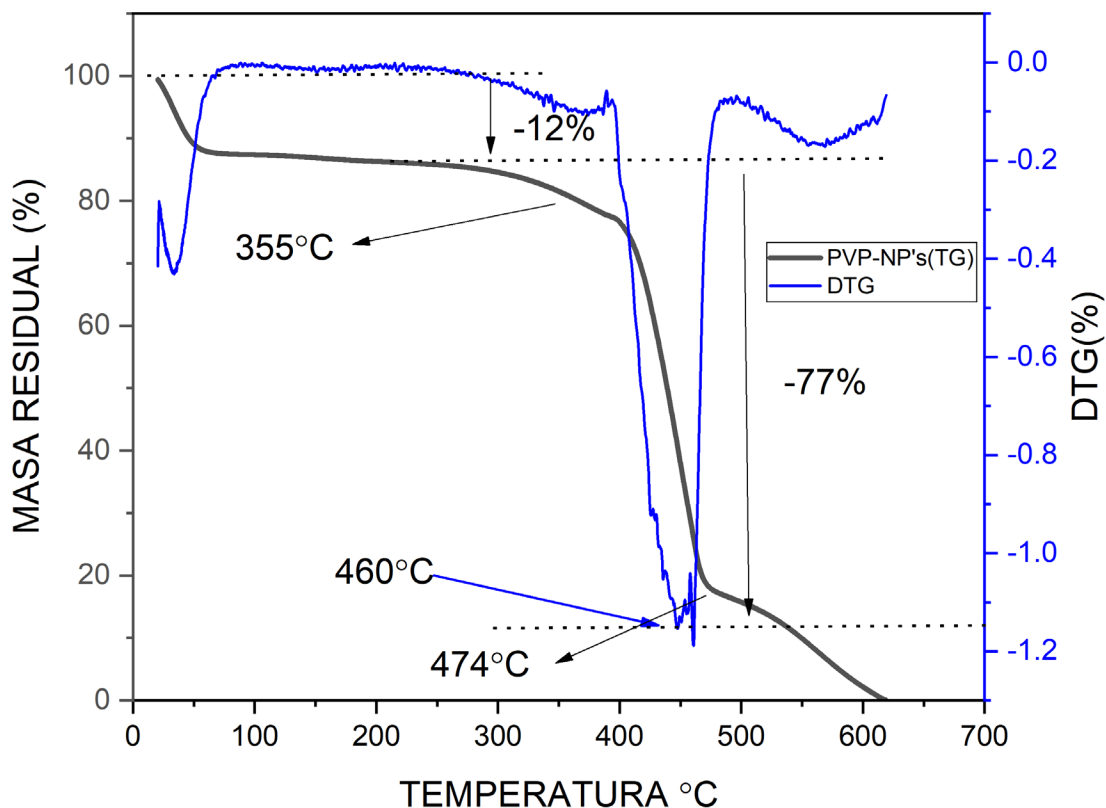


Figura 29. Análisis termogravimétrico de PVP.

Para PVP pura, la curva TG en la figura 29 muestra una pérdida de peso inicial de alrededor del 12% de 100 a 90°C, pérdida de agua y solventes, la pérdida de peso hasta este rango de temperatura se asigna a oligómeros, bajo peso molecular, pérdida de humedad y solvente residual en su rango de temperatura. La degradación de PVP se puede observar por encima de los 330°C, donde la pérdida de peso se puede atribuir a la descomposición del polímero estructural, hasta los 474 °C donde el pierde el 77% del peso. El punto más alto en la curva de la derivada nos indica que a la temperatura de 460°C es donde ocurre la mayor pérdida de masa

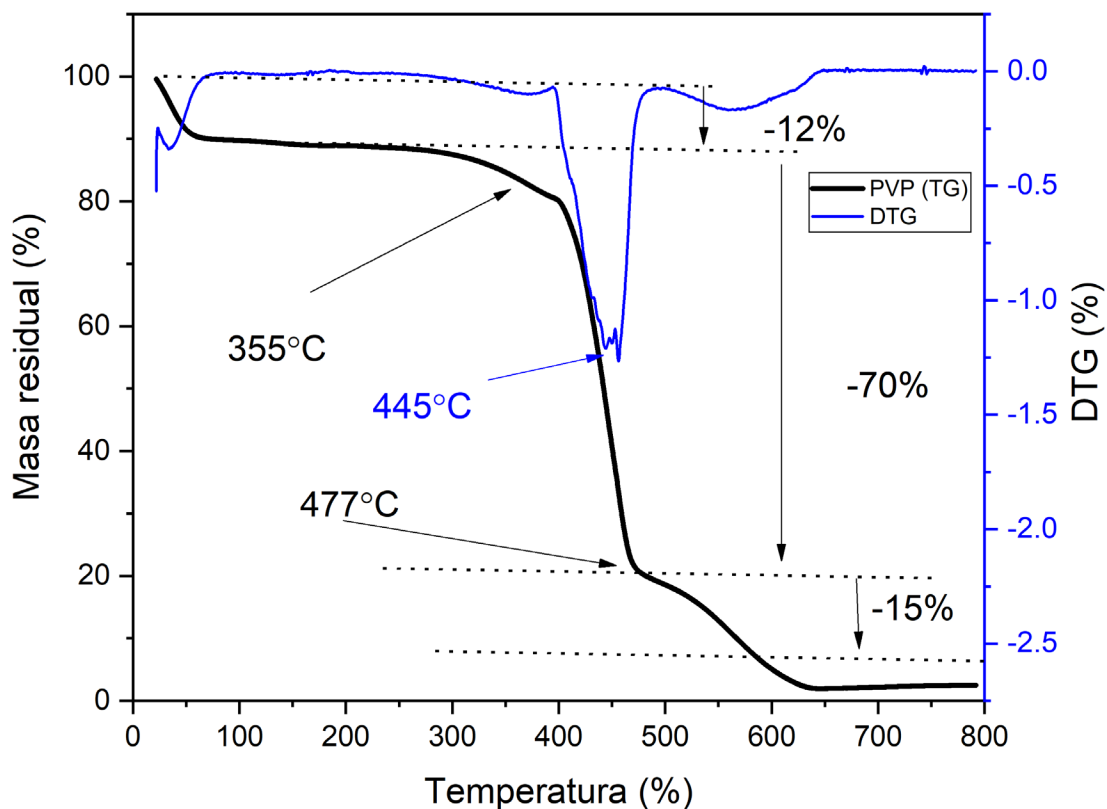


Figura 30. Análisis termogravimétrico de PVP con nanogeles.

Para PVP con NG's (figura 30), la curva TG muestra una pérdida de peso inicial de alrededor del 12% de 100 a 90 °C, pérdida de agua y solventes, la pérdida de peso hasta este rango de temperatura se asigna a oligómeros, bajo peso molecular, pérdida de humedad y solvente residual en su rango de temperatura. La degradación de PVP se puede observar por encima de los 330 °C muy similar a la PVP pura, donde la pérdida de peso se puede atribuir a la descomposición del polímero estructural, hasta los 477 °C donde el pierde el 70% del peso. El punto más alto en la curva de la derivada nos indica que a la temperatura de 445 °C es donde ocurre la mayor pérdida de masa, muy similar a la curva de PVP pura.

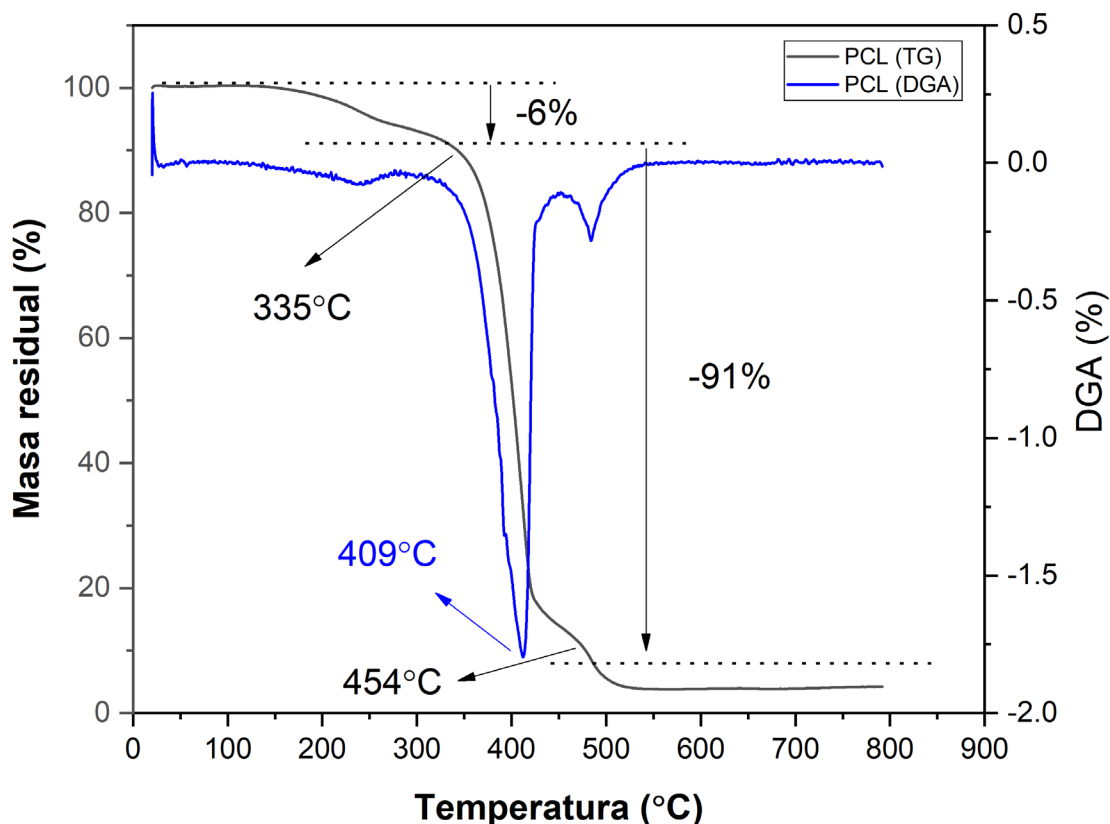


Figura 31. Análisis termogravimétrico de PCL.

Para PCL (figura 31), la curva TG muestra una pérdida de peso inicial de alrededor del 6% de 100 a 90 °C, pérdida de agua y solventes, la pérdida de peso hasta este rango de temperatura se asigna a oligómeros, bajo peso molecular, pérdida de humedad y solvente residual en su rango de temperatura. La degradación de PCL se puede observar por encima de los 330°C, donde la pérdida de peso se puede atribuir a la descomposición del polímero estructural, hasta los 454 °C donde el pierde el 95% del peso. El punto más alto en la curva de la derivada nos indica que a la y temperatura de 409 °C es donde ocurre la mayor pérdida de masa (Wu et al. 2022).

4.5 CAPACIDAD BIOADHESIVA DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN

Estos materiales como el PVP y PCL que tiene capacidades s y biodisolubles que consisten en polímeros sintéticos de baja toxicidad tienen un alto potencial para dispositivos médicos implantables(Zhu et al. 2018). Aunque en la literatura se encuentran más especificadas las propiedades en materiales como hidrogeles, ya que la interacción adhesiva está en función de la humectabilidad del polímero(Ito et al. 2022).

En otro estudio realizado en nanofibras de PVP por Zhang y colaboradores donde analizaron la adhesión *in situ* de las nanofibras a diferentes sustratos, explica que la fuerza de adhesión tiene relación con los sustratos conductores, interpretando que el aumento del voltaje puede ayudar a aumentar la fuerza de adhesión debido al diámetro de fibra más delgado y la fuerza electrostática mejorada (Ito et al. 2020, 2022; B. Zhang et al. 2020).

La fuerza de bioadhesión en este estudio se le atribuye principalmente a la capa de liberación PVP por tener un área mayor de contacto directo con el tejido cutáneo, el PCL contribuyó, aunque de menor manera para obtener la fuerza de adhesión con este estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12 siguiente:

Tabla 12. Fuerza de adhesión en N de TDDS.

Fuerza de adhesión	Promedio	DS
0.12N, 0.13N, 0.15N	0.13N	0.0125

4.6 PERMEACIÓN DEL 5-FU A PARTIR DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN

Para analizar la permeación del 5-FU después de la administración tópica de 5-FU se montó un sistema que permitiera simular las condiciones fisiológicas, manteniendo las

muestras a en agitación consante y a pH y temperatura correspondiente, como se mencionó en la metodología, con este sistema se utilizaron las celdas de Franz como se muestra en la figura 32.

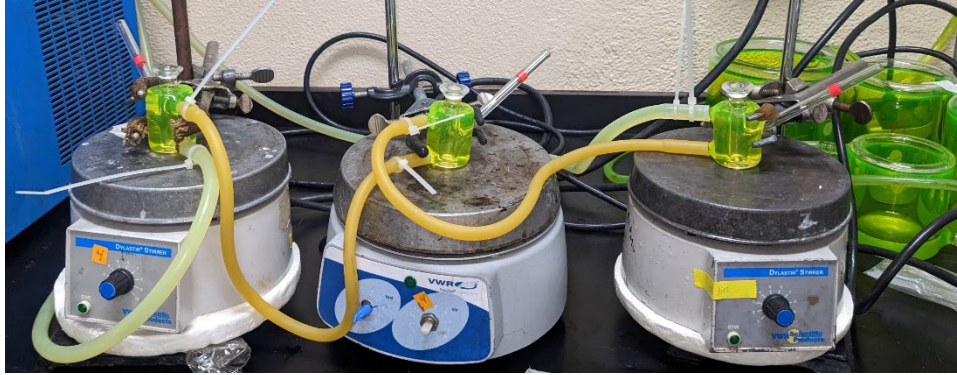


Figura 32. Sistema de difusión por celdas de Franz.

El análisis se realizó utilizando membranas sintéticas, pero solo como un procedimiento confirmatorio de la capacidad del sistema para liberar el fármaco. Las muestras obtenidas del receptor después de 24 h se analizaron en el espectro de UV- visible a 265 nm de longitud confirmando la presencia de 5-FU. Aunque las membranas artificiales no reproducen completamente los efectos de perturbación de los lípidos experimentados por las muestras biológicas, sí permiten realizar inferencias sobre los fenómenos de partición y difusión. Comparación de las membranas (figura 33).

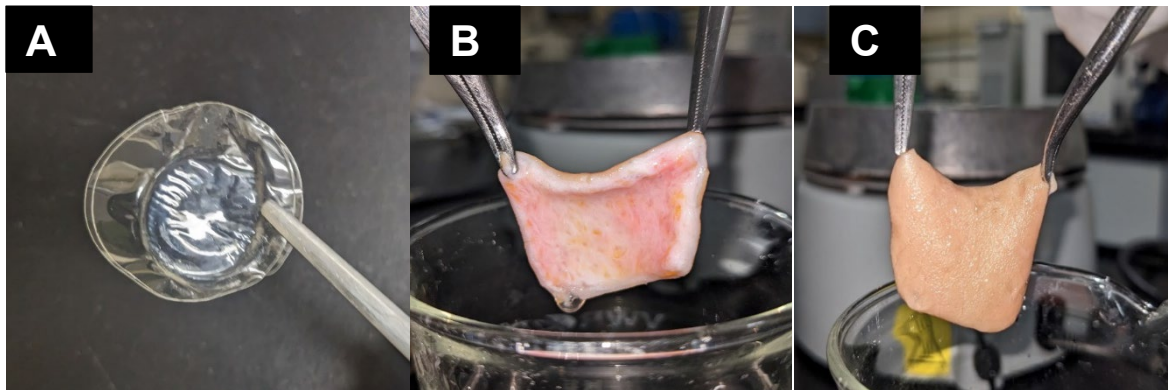


Figura 33. Membrana sintética (A), membrana biológica lado interno(B), membrana biológica lado externo (C).

Las bandas que se originan en el análisis de HPLC para 5-FU se identificaron mediante análisis de retención tiempo y espectro. Como solución estándar se utilizó una solución patrón de 5-FU a concentración 20 µg/ml preparado en buffer pH 7.4, para obtener el cromatograma que se encuentra en la figura 34. Donde se observa la banda para 5-FU a los 3min de tiempo de retención a una longitud de onda de 267 nm. (Figura 34).

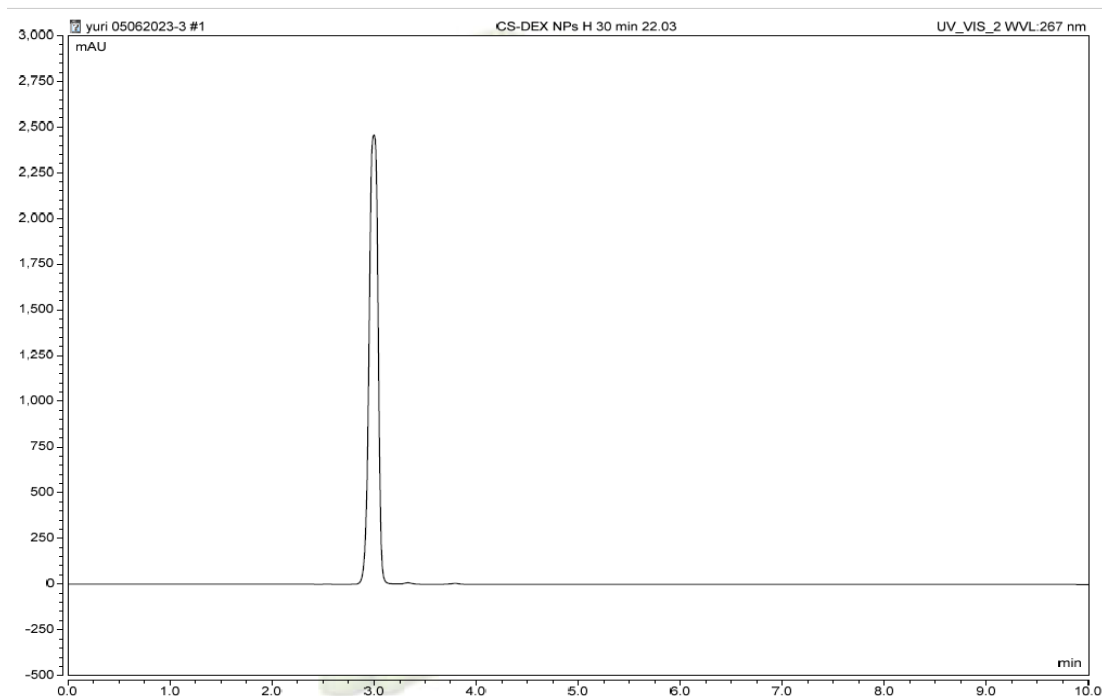


Figura 34. Cromatograma HPLC del estándar de 5-FU a 20µg/mL en buffer pH 7.4.

Los cromatogramas de las muestras se agruparon en una sola imagen que se muestra en la figura 35 donde se observan cinco cromatogramas y se hace una comparación de las diferentes muestras analizadas:

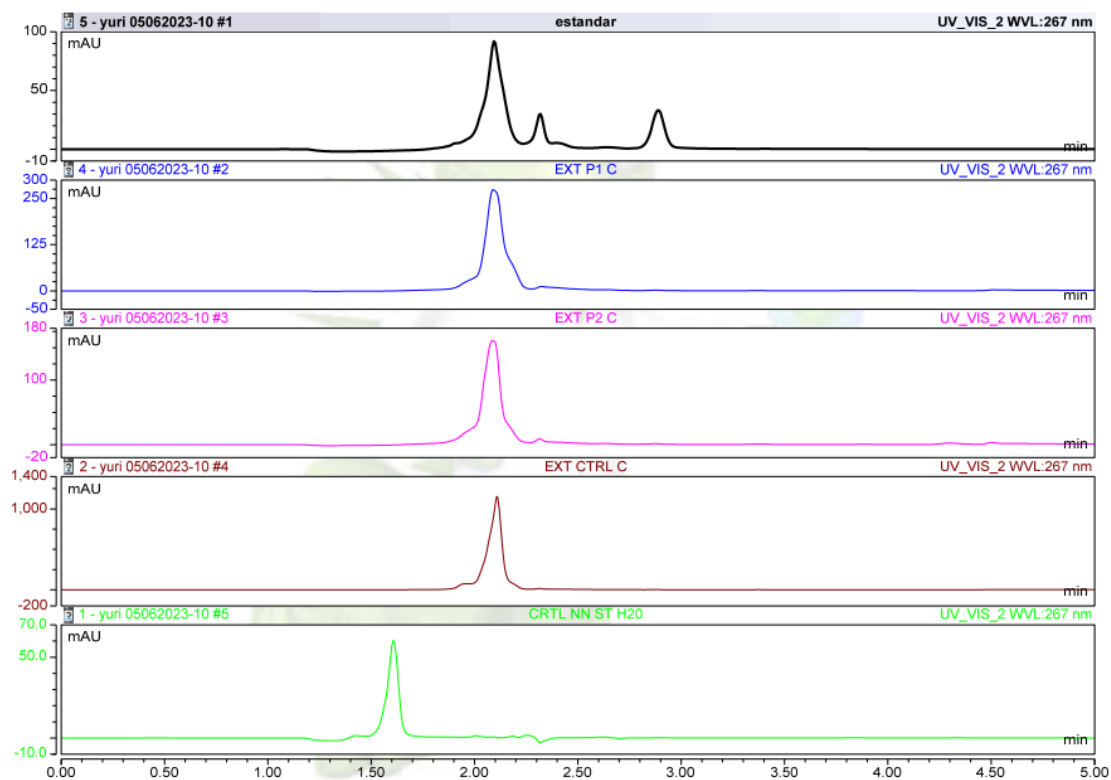


Figura 35. Comparación de los cromatogramas HPLC de las muestras obtenidas en el estudio permeación por difusión de 5-FU.

El cromatograma de línea negra se nombró como “estandar”, siendo esta una muestra obtenida de la solución receptora en la celda de difusión de Franz después de 24h, usando como donador una muestra del sistema de liberación desarrollado en este trabajo y como membrana, una membrana de permeación sintética, esto se hizo para asegurar la presencia de 5-FU en la muestra. Siendo esta la única en la que se observa una banda al minuto 3 correspondiente al 5-FU. Además, se muestran otras dos bandas de interferencia entre el min 1.4 y 2.5.

El cromatograma azul y el cromatograma rosa nombradas como “EXT P1 C” y “EXT P2 C” son muestras de la fase acuosa extraídas de la membrana ex vivo (tejido cutáneo), después de 24h de haber estado en contacto con el sistema de liberación en el sistema

de difusión con celdas Franz (figura 36). En este par de cromatogramas se pueden observar bandas de interferencia similares cerca del min 2.

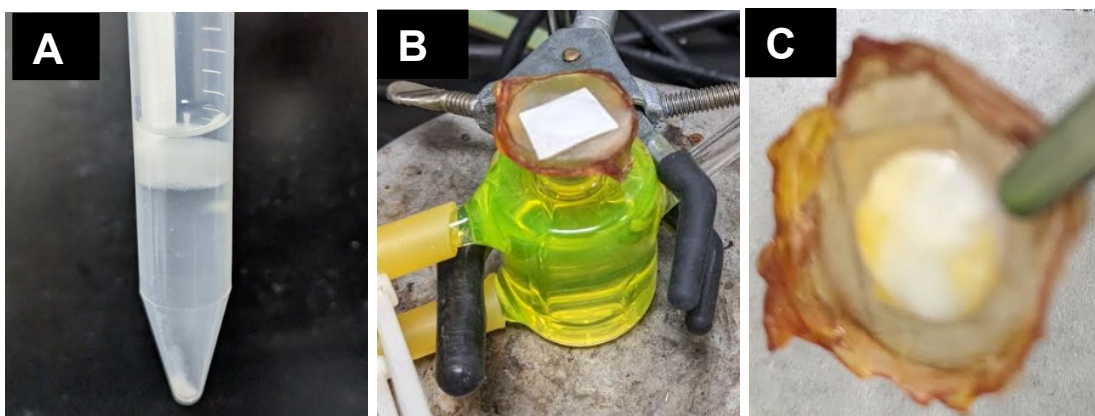


Figura 36. Separación de fases de la extracción de 5-FU de la membrana biológica(A). Membrana biológica colocada en la celda de Franz al inicio del experimento(B). Membrana después de 24h al terminar la difusión (C).

El cronograma siguiente en la imagen, de línea roja nombrado “EXT CTRL C”, es la muestra obtenida por extracción con la diferencia de que en el donador se colocó el fármaco puro. De igual manera muestra una banda de interferencia similar a los cronogramas anteriores

La de color verde es el cromatograma de la muestra de la solución receptora donde como donador se colocó el sistema de liberación. Se tomó a las 24h esperando obtener una muestra con una concentración mayor del fármaco que fuera más fácil de detectar. Observando solo una banda de interferencia (Mavromatis et al. 2022; Viegas et al. 2018). No se detectó la banda correspondiente a 5-FU en 4 de las 5 muestras analizadas y la banda a la que se le atribuye la presencia del 5-FU tiene una señal baja. Esto se puede explicar al efecto matriz (figura 37), el EM ocurre cuando se encuentran sustancias inherentes a la muestra de matriz biológica superpuestas al fármaco y picos cromatográficos asimétricos. Debido a esto, la investigación de la EM del proceso de

extracción de muestras biológicas se ha considerado obligatoria durante el desarrollo y validación de un método bioanalítico.

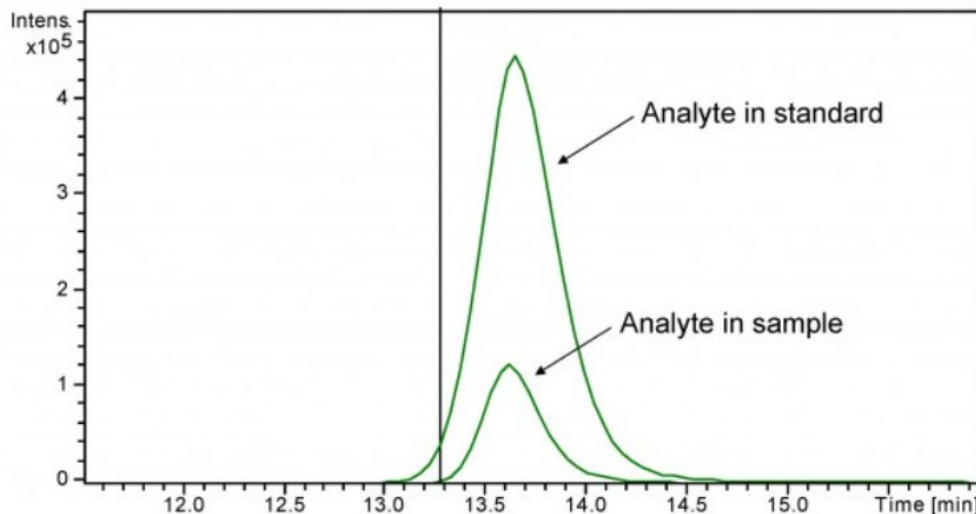


Figura 37. Efecto matriz, misma concentración de analito en el estándar y en la muestra biológica, pero gran diferencia en el área de las bandas.

El método utilizado se basó en lo presentado por Viegas y colaboradores (Viegas et al. 2018), donde explican que se utilizó con éxito un método para extraer posteriormente los picos o bandas "método de adición posterior a la extracción". Brevemente, este método consistió en la inyección directa de una muestra de piel en blanco extraída, enriquecida después del protocolo completo de preparación de la muestra con diferentes concentraciones de 5-FU [34]. Los porcentajes de EM se calcularon comparando las áreas de los picos del estándar con las obtenidas por inyección directa de la misma concentración del 5-FU solubilizado en agua, sin matriz. Se realizaron varias pruebas para minimizar la EM con diferentes disolventes orgánicos que fueron éter etílico, hexano, acetato de etilo y cloruro de metileno como agentes precipitantes. Sin embargo, se lograron resultados prometedores exclusivamente cuando se utilizó acetato de etilo, y esto puede explicarse porque se trata de un éster, un grupo químico que puede

presentar interacciones de alta afinidad con los componentes de la piel, principalmente lípidos y colágenos.

Este método "método de adición posterior a la extracción" evalúa los efectos de la matriz comparando la respuesta de la señal de un analito en fase móvil pura con la respuesta de la señal de una cantidad equivalente del analito en la muestra de matriz en blanco enriquecida después de la extracción. La diferencia en la respuesta determina el alcance del efecto matriz.

Explicado de otra manera, donde el área de la banda del analito objetivo que se ha añadido a la matriz biológica antes de la preparación de la muestra se compara con el área del mismo analito añadido después de la extracción al extracto de fluido biológico

4.7 CITOTOXICIDAD CELULAR Y SINERGISMO

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se pueden utilizar para predecir la toxicidad humana y para la detección general de sustancias químicas. La citotoxicidad es una medida del daño o muerte celular causado por agentes tóxicos. Los ensayos de citotoxicidad se centran en detectar el alcance del daño o la muerte celular causados por agentes (Fotakis and Timbrell 2006). Estos ensayos proporcionan información sobre los efectos directos de una sustancia en las células, lo que puede resultar útil para identificar posibles dianas terapéuticas o comprender los mecanismos subyacentes a la toxicidad (Fotakis and Timbrell 2006). Para el ensayo MTT, se corrigió el fondo de muestras de diferentes densidades celulares restando los valores de absorbancia del control sin células (fondo) de los de los pocillos que contenían células. Los resultados se representaron como valores de absorbancia frente a células por pocillo.

El efecto del tratamiento con los los diferentes parches sobre las células se calculó utilizando la siguiente ecuación: $\%citotoxicidad = 100 - viabilidad\ celular$

Donde Control (-) es el valor de absorbancia de las células no tratadas, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13B.

Tabla 13A. Datos de los estudios de citotoxicidad

Melanoma				
(B16F10)				
Ctrl(-)	1	2	3	
		7 µg/mL	7 µg/mL	
Células	PVP/NGs	PVP/NGs+5-FU	PVP/5-FU	
1.3173	0.53	0.1932	0.349	
1.2537	0.5852	0.1846	0.3558	
1.2599	0.5879	0.228	0.3699	
	0.5371	0.2093	0.3671	
1.277	0.560	0.204	0.360	
DS	0.035	0.019	0.010	

Tabla 13B. Datos de los estudios de citotoxicidad en %

	Células	PVP/NGs	PVP/NGs+5-FU	PVP/5-FU
%	100	44	16	28
DS	3.5	3.1	1.9	1.0

El control (-) representa el 100% de las células viables, contrastando con el 44% de las nanofibras que solo contienen nanogeles, lo que confirma la citotoxicidad de los nanogeles por si solos. A demás se hizo una comparación por el análisis estadístico ANOVA demostrando que existe una diferencia significativa ANEXO 5. Lo mismo para demostrar la sinergia de la combinación de nanogeles cargados con 5-FU en las nanofibras donde se observa que existe un descenso en la viabilidad celular debido a la citotoxicidad mayor en comparación con las nanofibras cargadas solo con el fármaco como lo muestra la gráfica en la figura 38. En la figura, los datos se presentan como media \pm SE; n=4. * P <0.05 ** P <0.01, *** P <0.001 frente al grupo tratado como control negativo (Viabilidad celular 100%).

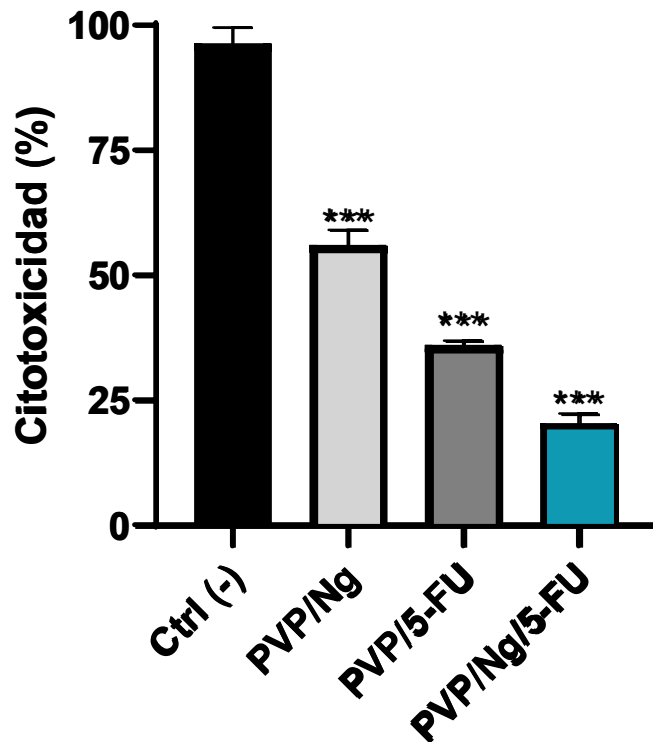


Figura 38. Ensayo de citotoxicidad de los materiales estudiados. Los datos se presentan como media \pm SE; n =4. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ frente al grupo tratado como control negativo (Viabilidad celular 100%), One Way ANOVA. Fisher's LSD post-hoc comparison.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

En este estudio, se buscó desarrollar un TDDS para el fármaco antineoplásico 5-FU mediante la síntesis de nanogeles catiónicos incorporados a nanofibras de PVP. Los nanogeles sintetizados con DVA mostraron inestabilidad, descartándolos para el proyecto, pero la síntesis exitosa de nanogeles entrecruzados con EGDMA superó este inconveniente, se produjeron partículas de nanogeles estables entrecruzadas con EGDMA con diámetros hidrodinámicos (Dh) promedio de 70 nm, mostrando sensibilidad a diferentes pH con un aumento a pH 1 por posible aglomeración y una disminución a pH 5 con Dh promedio de 62 nm.

Aunque la cinética de liberación del fármaco a partir de los nanogeles no difería del fármaco libre, la carga exitosa abre la puerta a futuras investigaciones. Se logró la incorporación de 1% p/v de nanogeles a las nanofibras de PVP y la creación de un sistema bicapa biocompatible con una capa "backing" de PCL. La capacidad bioadhesiva del sistema fue medida en 0.13 N, indicando una potencial adherencia efectiva. Sin embargo, la dificultad para observar la presencia del fármaco en los perfiles cromatográficos HPLC destaca un desafío en la evaluación precisa de la permeación ex vivo, aunque la liberación del fármaco fue confirmada en el ensayo de permeación in vitro utilizando membranas sintéticas. La confirmación de la citotoxicidad y sinergismo en células de melanoma B16F10 respalda la eficacia del sistema, con diferencias estadísticamente significativas frente al grupo de control positivo. A pesar de algunos desafíos, estos resultados sugieren avances prometedores hacia un sistema de administración transdérmica eficaz para el 5-FU. Se recomienda abordar los desafíos identificados, como la optimización de la evaluación de permeación, para continuar

avanzando en el desarrollo de esta innovadora estrategia farmacoterapéutica contra el melanoma.

CAPITULO VI
REFERENCIAS

- Abdelrazek, E.M., A.M. Hezma, A. El-khodary, and A.M. Elzayat. 2016. "Spectroscopic Studies and Thermal Properties of PCL/PMMA Biopolymer Blend." *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(1): 10–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2015.06.001>.
- Akalin, Elif, Sevim Akyuz, and Tanil Akyuz. 2007. "Adsorption and Interaction of 5-Fluorouracil with Montmorillonite and Saponite by FT-IR Spectroscopy." *Journal of Molecular Structure* 834–836(SPEC. ISS.): 477–81.
- Aliabadi, Parsa et al. 2022. "Restoration of MiR-648 Overcomes 5-FU-Resistance through Targeting ET-1 in Gastric Cancer Cells in-Vitro." *Pathology Research and Practice* 239(July): 154139. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154139>.
- Alli, Sauliha et al. 2023. "Understanding the Perceived Relationship between Sun Exposure and Melanoma in Atlantic Canada: A Consensual Qualitative Study Highlighting a 'Sunscreen Paradox.'" *Cancers* 15(19).
- Amaly, J. I. et al. 2004. "Synthesis and Characterization of Novel PH-Responsive Microgels Based on Tertiary Amine Methacrylates." *Langmuir* 20(21): 8992–99.
- Amini, Shahram et al. 2020. "Application of Electrospun Polycaprolactone Fibers Embedding Lignin Nanoparticle for Peripheral Nerve Regeneration: In Vitro and in Vivo Study." *International Journal of Biological Macromolecules* 159: 154–73.
- Antiqueira-santos, Priscila et al. 2021. "Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis of Pyrazoline Fatty Chain Derivatives and Its Effects on Melanoma Cells." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 41(March): 127988. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127988>.
- Argentiere, Simona et al. 2009. "Synthesis of Poly (Acrylic Acid) Nanogels and Application in Loading and Release of an Oligothiophene Fluorophore and Its Bovine Serum Albumin Conjugate." : 69–76.
- Atashgahi, Mahboubeh et al. 2021. "Epinephrine-Entrapped Chitosan Nanoparticles Covered by Gelatin Nanofibers: A Bi-Layer Nano-Biomaterial for Rapid Hemostasis." *International Journal of*

Pharmaceutics 608(July).

Bálintová, Lucia, Miroslava Matúšková, and Alena Gábelová. 2022. "The Evaluation of the Efficacy and Potential Genotoxic Hazard of Combined SAHA and 5-FU Treatment in the Chemoresistant Colorectal Cancer Cell Lines." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 874–875(July 2021).

Bañobre-López, Manuel, Antonio Teijeiro, and Jose Rivas. 2013. "Magnetic Nanoparticle-Based Hyperthermia for Cancer Treatment." *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 18(6): 397–400.

Barbosa, Ana Isabel, Sofia A.Costa Lima, Ibraheem Yousef, and Salette Reis. 2023. "Evaluating the Skin Interactions and Permeation of Alginate/Fucoidan Hydrogels Per Se and Associated with Different Essential Oils." *Pharmaceutics* 15(1).

Besson, Caroline et al. 2021. "Common Genetic Polymorphisms Contribute to the Association between Chronic Lymphocytic Leukaemia and Non-Melanoma Skin Cancer." *International Journal of Epidemiology* 50(4): 1325–34.

Bhattarai, Rajan Sharma, Rinda Devi Bachu, Sai H S Boddu, and Sarit Bhaduri. 2019. "Biomedical Applications of Electrospun Nanofibers : Drug and Nanoparticle Delivery." *Pharmaceutics* 11(5): 2–30.

Boland, Patrick M., and Howard S. Hochster. 2021. "Making Fluorouracil 'Sexy' Again." *Journal of the National Cancer Institute* 113(4): 351–52.

Bozzuto, Giuseppina, and Agnese Molinari. 2015. "Liposomes as Nanomedical Devices." *International Journal of Nanomedicine* 10: 975–99.

Budman, Daniel R., Anthony Calabro, Lisa Rosen, and Martin Lesser. 2012. "Identification of Unique Synergistic Drug Combinations Associated with Downexpression of Survivin in a Preclinical Breast Cancer Model System." *Anti-Cancer Drugs* 23(3): 272–79.

- Bulbul, Y. Emre, Melda Eskitoros-Togay, Funda Demirtas-Korkmaz, and Nursel Dilsiz. 2019. "Multi-Walled Carbon Nanotube-Incorporating Electrospun Composite Fibrous Mats for Controlled Drug Release Profile." *International Journal of Pharmaceutics* 568(May): 118513.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118513>.
- Cen, Dong et al. 2020. "Implantable Fibrous 'Patch' Enabling Preclinical Chemo-Photothermal Tumor Therapy." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 192(April): 111005.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111005>.
- Chen, L. et al. 2022. "OQL036 Topical Gel Inhibits the Skin Toxicity Associated with 5-Fluorouracil/Capecitabine: Results from in Vitro and in Vivo Preclinical Studies." *European Journal of Cancer* 174(October): S77–78.
- Chen, Menglin et al. 2012. "Chitosan / SiRNA Nanoparticles Encapsulated in PLGA Nano Fibers for SiRNA Delivery." *ACS Nano* 6(6): 4835–44.
- Chen, Xiaobo, Chun Xu, and Hong He. 2019. "Electrospinning of Silica Nanoparticles-Entrapped Nanofibers for Sustained Gentamicin Release." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516(4): 1085–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.163>.
- Choukaife, Hazem, Abd Almonem Doolaanea, and Mulham Alfatama. 2020. 13 Pharmaceuticals *Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables*.
- Claudio-rizo, Jesús A, Lucia F Cano Salazar, Tirso E Flores-guia, and Denis A Cabrera-munguia. 2021. "Estructuras Metal-Orgánicas (MOFs) Nanoestructuradas Para La Liberación Controlada de Fármacos Nanostructured Metal-Organic Frameworks (MOFs) Applied to Controlled Drug Delivery." 14(26): 1–29.
- Cornejo-Bravo, Jose M., and Ronald A. Siegel. 1996. "Water Vapour Sorption Behaviour of Copolymers of N,N-Diethylaminoethyl Methacrylate and Methyl Methacrylate." *Biomaterials* 17(12): 1187–93.
- Dimde, Mathias, Falko Neumann, Felix Reisbeck, and Svenja Ehrmann. 2017. "Biomaterials Science."

- Duan, Gaigai et al. 2021. "Core Effect on Mechanical Properties of One Dimensional Electrospun Core-Sheath Composite Fibers." *Composites Communications* 25(May): 100773.
<https://doi.org/10.1016/j.coco.2021.100773>.
- Dvořánková, Barbora et al. 2017. "Intercellular Crosstalk in Human Malignant Melanoma." *Protoplasma* 254(3): 1143–50.
- Elder, David E. et al. 2020. "The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 144(4): 500–522.
- Escalona Rayo, Oscar, and David Quintanar Guerrero. 2014. "Nanogeles Poliméricos: Una Nueva Alternativa Para La Administración de Fármacos Polymeric Nanogels: A New Alternative for Drug Delivery." *Revista Mexicana de Ciencias*: 17–38.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000300003&lng=es&tlng=es.
- Ewert de Oliveira, Beatriz et al. 2021. "5-Fluorouracil, Innovative Drug Delivery Systems to Enhance Bioavailability for Topical Use." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 61(October).
- Fadil, Fatirah et al. 2021. "Review on Electrospun Nanofiber-Applied Products." *Polymers* 13(13): 1–29.
- Felipe, Andrés et al. 2019. "PEO-Chitosan Nano Fibers Containing Carboxymethyl-Hexanoyl Chitosan / Dodecyl Sulfate Nanoparticles Loaded with Pyrazoline for Skin Cancer Treatment." *European Polymer Journal* 119(June): 335–43. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.001>.
- Fotakis, George, and John A. Timbrell. 2006. "In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride." *Toxicology Letters* 160(2): 171–77.
- Gallo, Richard L. 2017. "Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes." *Journal of Investigative Dermatology* 137(6): 1213–14.

- Ghaffari-Bohlouli, Pejman, Payam Zahedi, and Mohsen Shahrousvand. 2020. "Enhanced Osteogenesis Using Poly (L-Lactide-Co-D, L-Lactide)/Poly (Acrylic Acid) Nanofibrous Scaffolds in Presence of Dexamethasone-Loaded Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles." *International Journal of Biological Macromolecules* 165: 2363–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.078>.
- Ghafoor, Bakhtawar, Amna Aleem, Murtaza Najabat Ali, and Mariam Mir. 2018. "Review of the Fabrication Techniques and Applications of Polymeric Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Systems." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 48(August): 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.09.005>.
- Gorain, Bapi et al. 2022. "Advanced Drug Delivery Systems Containing Herbal Components for Wound Healing." *International Journal of Pharmaceutics* 617(February): 121617. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121617>.
- Gruppuso, Martina, Gianluca Turco, Eleonora Marsich, and Davide Porrelli. 2021. "Polymeric Wound Dressings, an Insight into Polysaccharide-Based Electrospun Membranes." *Applied Materials Today* 24: 101148.
- Guo, Tingwang et al. 2019. "Keratin Nanoparticles-Coating Electrospun PVA Nanofibers for Potential Neural Tissue Applications." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 30(9): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6207-5>.
- de Guzman, Roche C. et al. 2011. "Mechanical and Biological Properties of Keratose Biomaterials." *Biomaterials* 32(32): 8205–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.054>.
- Haghniaz, Reihaneh et al. 2023. "Tissue Adhesive Hemostatic Microneedle Arrays for Rapid Hemorrhage Treatment." *Bioactive Materials* 23(June 2022): 314–27. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.08.017>.
- Haider, Adnan, Sajjad Haider, and Inn Kyu Kang. 2018. "A Comprehensive Review Summarizing the Effect of Electrospinning Parameters and Potential Applications of Nanofibers in Biomedical and

- Biotechnology." *Arabian Journal of Chemistry* 11(8): 1165–88.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>.
- Han, Xiao et al. 2020. "Local and Targeted Delivery of Immune Checkpoint Blockade Therapeutics." *Accounts of Chemical Research* 53(11).
- Han, Y. et al. 2022. "Application of Polymers in Promoting Transdermal Absorption." *Materials Today Chemistry* 26.
- Hayashi, Hisato, Michihiro Iijima, Kazunori Kataoka, and Yukio Nagasaki. 2004. "PH-Sensitive Nanogel Possessing Reactive PEG Tethered Chains on the Surface." *Macromolecules* 37(14): 5389–96.
- Haydont, Valérie, Bruno A. Bernard, and Nicolas O. Fortunel. 2019. "Age-Related Evolutions of the Dermis: Clinical Signs, Fibroblast and Extracellular Matrix Dynamics." *Mechanisms of Ageing and Development* 177(March 2018): 150–56. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.03.006>.
- He, Jiahui, Yuyue Zhang, Xinge Yu, and Chenjie Xu. 2023. "Wearable Patches for Transdermal Drug Delivery." *Acta Pharmaceutica Sinica B* 13(6): 2298–2309.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.05.009>.
- Hegazy, Mohammad et al. 2020. "Facile Synthesis of Poly(DMAEMA-Co-MPS)-Coated Porous Silica Nanocarriers as Dual-Targeting Drug Delivery Platform: Experimental and Biological Investigations." *Acta Chimica Slovenica* 67(2): 462–68.
- Hu, Yi dou et al. 2023. "LY6/PLAUR Domain Containing 3 (LYPD3) Maintains Melanoma Cell Stemness and Mediates an Immunosuppressive Microenvironment." *Biology Direct* 18(1): 1–19.
- Hwang, Tsong Long et al. 2015. "Cationic Additives in Nanosystems Activate Cytotoxicity and Inflammatory Response of Human Neutrophils: Lipid Nanoparticles versus Polymeric Nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine* 10(January): 371–85.
- Ishitsuka, Yosuke. 2020. "Loricrin : Past , Present , and Future." 12(Li).
- Ismail, Hesham M., Sandi Ali-Adib, and Husam M. Younes. 2019. "Reactive and Functionalized

- Electrospun Polymeric Nanofibers for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications.” *Therapeutic Delivery* 10(7): 397–99.
- Ito, Tomoko et al. 2020. “Bioadhesive and Biodissolvable Hydrogels Consisting of Water-Swellable Poly(Acrylic Acid)/Poly(Vinylpyrrolidone) Complexes.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 108(2): 503–12.
- . 2022. “Preparation of a Bioadhesive Poly(Acrylic Acid)/Polyvinylpyrrolidone Complex Gel and Its Clinical Effect on Dental Hemostasis.” *Gels* 8(8).
- Jia, Zixian et al. 2023. “Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing.” *Colloids and Interfaces* 7(1).
- Jiang, Tianyue et al. 2021. “Enzyme-Instructed Hybrid Nanogel/Nanofiber Oligopeptide Hydrogel for Localized Protein Delivery.” www.elsevier.com/locate/apsbwww.sciencedirect.com (February 18, 2022).
- Joshi, Naveen, Sina Azizi Machekposhti, and Roger J. Narayan. 2023. “Evolution of Transdermal Drug Delivery Devices and Novel Microneedle Technologies: A Historical Perspective and Review.” *JID Innovations* 3(6): 100225. <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2023.100225>.
- Jun, Eunsung et al. 2017. “Synergistic Effect of a Drug Loaded Electrospun Patch and Systemic Chemotherapy in Pancreatic Cancer Xenograft.” *Scientific Reports* 7(1): 1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12670-3>.
- Juncos Bombin, Adrian D., Nicholas J. Dunne, and Helen O. McCarthy. 2020. “Electrospinning of Natural Polymers for the Production of Nanofibres for Wound Healing Applications.” *Materials Science and Engineering C* 114(February): 110994. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110994>.
- Kalva, Sumama Nuthana et al. 2021. “Active Agents Loaded Extracellular Matrix Mimetic Electrospun Membranes for Wound Healing Applications.” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 63(January): 102500. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102500>.

- Kamsani, Nurul Huda et al. 2021. "Biomedical Application of Responsive 'Smart' Electrospun Nanofibers in Drug Delivery System: A Minireview." *Arabian Journal of Chemistry* 14(7): 103199.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103199>.
- Katsogiannis, Kontastino Alexandros, Vladislavljević, G.T., Georgiadou, Stella. 2015. "Porous Electrospun Polycaprolactone (PCL) Fibres by Phase Separation." *European Polymer Journal* 69: 284–95.
- Kaur, Damanpreet, Ashish Gupta, Nahar Singh, and Sanjay R. Dhakate. 2015. "Anti-Emetic Drug Delivery for Cancer Patients through Electrospun Composite Nanofibers Transdermal Patch: In Vitro Study." *Advanced Materials Letters* 6(1): 33–39.
- Khan, Atta ur Rehman et al. 2021. "Multifunctional Bioactive Core-Shell Electrospun Membrane Capable to Terminate Inflammatory Cycle and Promote Angiogenesis in Diabetic Wound." *Bioactive Materials* 6(9): 2783–2800.
- Khodadadi, Meysam et al. 2020. "Recent Advances in Electrospun Nanofiber-Mediated Drug Delivery Strategies for Localized Cancer Chemotherapy."
- Khoshnoudi-Nia, Sara, Niloufar Sharif, and Seid Mahdi Jafari. 2020. "Loading of Phenolic Compounds into Electrospun Nanofibers and Electrospayed Nanoparticles." *Trends in Food Science and Technology* 95(November 2019): 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.013>.
- Knox, Sophie, and Niamh M. O'Boyle. 2021. "Skin Lipids in Health and Disease: A Review." *Chemistry and Physics of Lipids* 236(February): 105055. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105055>.
- Krogstad, Emily A. et al. 2017. "Nanoparticle-Releasing Nanofiber Composites for Enhanced in Vivo Vaginal Retention." *Biomaterials* 144: 1–16.
- Lan, Xingzi et al. 2021. "Multidrug-Loaded Electrospun Micro/Nanofibrous Membranes: Fabrication Strategies, Release Behaviors and Applications in Regenerative Medicine." *Journal of Controlled Release* 330(September 2020): 1264–87. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.036>.
- Langer, Robert, and Judah Folkman. 1976. "Polymers for the Sustained Release of Proteins and Other

- Macromolecules." *Nature* 263(5580): 797–800.
- Li, Jiannong et al. 2022. "Single-Cell Characterization of the Cellular Landscape of Acral Melanoma Identifies Novel Targets for Immunotherapy." *Clinical Cancer Research* 28(10): 2131–46.
- Li, Jie et al. 2020. "Nanoparticle Drug Delivery System for Glioma and Its Efficacy Improvement Strategies: A Comprehensive Review." *International Journal of Nanomedicine* 15: 2563–82.
- Li, Xiaofan et al. 2022. "Theoretical Insights into the Transformation Mechanism and Eco-Toxicity Effects of 5-Fluorouracil by O₃ and ·OH in Waters." *Process Safety and Environmental Protection* 160: 541–50. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.02.045>.
- Lim, Kyung Min. 2021. "Skin Epidermis and Barrier Function." *International Journal of Molecular Sciences* 22(6): 1–3.
- Lindqvist, Pelle G., Elisabeth Epstein, and Mona Landin-Olsson. 2022. "Sun Exposure - Hazards and Benefits." *Anticancer Research* 42(4): 1671–77.
- Liu, Yueqi et al. 2021. "Recent Development of Electrospun Wound Dressing." *Current Opinion in Biomedical Engineering* 17: 100247. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2020.100247>.
- Mahamat-Saleh, Yahya et al. 2019. "Mediterranean Dietary Pattern and Skin Cancer Risk: A Prospective Cohort Study in French Women." *American Journal of Clinical Nutrition* 110(4): 993–1002. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz173>.
- . 2023. "Baseline and Lifetime Alcohol Consumption and Risk of Skin Cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort (EPIC)." *International Journal of Cancer* 152(3): 348–62.
- Maher, Pamela et al. 2018. "The Role of Ca²⁺ in Cell Death Caused by Oxidative Glutamate Toxicity and Ferroptosis." *Cell Calcium* 70: 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.007>.
- Manzanares-Guevara, Lizbeth A. et al. 2020. "Smart Nanoformulation Based on Stimuli-Responsive Nanogels and Curcumin: Promising Therapy against Colon Cancer." *ACS Omega* 5(16): 9171–84.

Manzanares-Guevara, Lizbeth A., Angel Licea-Claverie, Irasema Oroz-Parra, and Alexei F. Licea-Navarro.

2018. "On the Cytotoxicity of a Cationic Tertiary Amine PEGylated Nanogel as Nanocarrier for Anticancer Therapies." *MRS Communications* 8(3): 1204–10.

Manzanares-Guevara, Lizbeth A., Angel Licea-Claverie, and Francisco Paraguay-Delgado. 2018.

"Preparation of Stimuli-Responsive Nanogels Based on Poly(N,N-Diethylaminoethyl Methacrylate) by a Simple 'Surfactant-Free' Methodology." *Soft Materials* 16(1): 37–50.

<http://dx.doi.org/10.1080/1539445X.2017.1391845>.

Marek, Steve R., Charles A. Conn, and Nicholas A. Peppas. 2010. "Cationic Nanogels Based on

Diethylaminoethyl Methacrylate." *Polymer* 51(6): 1237–43.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2010.01.060>.

Mavromatis, Petros et al. 2022. "Development of an HPLC-DAD Method for the Extraction and

Quantification of 5-Fluorouracil, Uracil, and 5-Fluorodeoxyuridin Monophosphate in Cells and Culture Media of *Lactococcus Lactis*." *Separations* 9(11).

Mehdi Khanmohammadi, Vahid Zolfagharzadeh, Zohreh Bagher, Hadi Soltani, and Jafar A. 2019.

"Cell Encapsulation in Core-Shell Microcapsules through Coaxial Electrospinning System and Horseradish Peroxidase-Catalyzed Crosslinking." (111): 0–13.

Mehnath, Sivaraj, Karuppanan Chitra, Kandhasamy Karthikeyan, and Murugaraj Jeyaraj. 2020.

"Localized Delivery of Active Targeting Micelles from Nanofibers Patch for Effective Breast Cancer Therapy." *International Journal of Pharmaceutics* 584(May): 119412.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119412>.

Mohamady Hussein, Mohamed Ahmed et al. 2021. "Dual-Drug Delivery of Ag-Chitosan Nanoparticles

and Phenytoin via Core-Shell PVA/PCL Electrospun Nanofibers." *Carbohydrate Polymers*

270(February): 118373. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118373>.

Mohamed, Aezeden, and Malcolm Mengqiu Xing. 2012. "Nanomaterials and Nanotechnology for Skin

- Tissue Engineering." *International journal of burns and trauma* 2(1): 29–41.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928165><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3415966>.
- Mohamed, Mona B., Nour T. Abdel-Ghani, Ola M. El-Borady, and Mostafa A. El-Sayed. 2012. "5-Fluorouracil Induces Plasmonic Coupling in Gold Nanospheres: New Generation of Chemotherapeutic Agents." *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* 3(7): 3.
- Monika, Bhairam et al. 2012. "Transdermal Drug Delivery System with Formulation and Evaluation Aspects: Overview." *Research Journal of Pharmacy and Technology* 5(9): 1168–76.
- Muggia, Franco M., Godefridus J. Peters, and Joseph R. Landolph. 2009. "XIII International Charles Heidelberger Symposium and 50 Years of Fluoropyrimidines in Cancer Therapy Held on September 6 to 8, 2007 at New York University Cancer Institute, Smilow Conference Center." *Molecular Cancer Therapeutics* 8(5): 992–99.
- Nassar, Kelsey W., and Aik Choon Tan. 2020. "The Mutational Landscape of Mucosal Melanoma." *Seminars in Cancer Biology* 61: 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.09.013>.
- Ng, Shiow Fern et al. 2010. "Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for in Vitro Permeation Studies." *AAPS PharmSciTech* 11(3): 1432–41.
- Nicolás-Morala, Jimena et al. 2022. "In Vitro 5-Fluorouracil Resistance Produces Enhanced Photodynamic Therapy Damage in SCC and Tumor Resistance in BCC." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 233(May).
- Obu, Queen S. et al. 2021. "Synthesis, Spectra (FT-IR, NMR) Investigations, DFT Study, in Silico ADMET and Molecular Docking Analysis of 2-Amino-4-(4-Aminophenyl)Thiophene-3-Carbonitrile as a Potential Anti-Tubercular Agent." *Journal of Molecular Structure* 1244: 130880.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130880>.
- Onugwu, Aadaeze Linda et al. 2023. "Nanotechnology Based Drug Delivery Systems for the Treatment of

- Anterior Segment Eye Diseases.” *Journal of Controlled Release* 354(December 2022): 465–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.018>.
- Palomino, K., J. M. Cornejo-Bravo, H. Magaña, and A. Serrano-Medina. 2018. “Microstructured Hydrogels with Modulated Transition Temperature for Positive Control Release.” *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 13(1): 141–54.
- Pant, Bishweshwar, Mira Park, and Soo Jin Park. 2019. “Drug Delivery Applications of Core-Sheath Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning: A Review.” *Pharmaceutics* 11(7).
- Patel, DasharathM, ChhaganN Patel, and RushirajH Jani. 2011. “Design and Evaluation of Colon Targeted Modified Pulsincap Delivery of 5-Fluorouracil According to Circadian Rhythm.” *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 1(3): 172.
- Peng, Shaojun, Fengfeng Xiao, Meiwan Chen, and Huile Gao. 2022. “Tumor-Microenvironment-Responsive Nanomedicine for Enhanced Cancer Immunotherapy.” *Advanced Science* 9(1): 1–25.
- Peres, Luana Becker, Laize Becker Peres, Tatiany J Faria, and João Vitor De Assis. 2017. “PLLA / PMMA Blend in Polymer Nanoparticles : Influence of Processing Methods.”
- Peris, K. et al. 2019. “Diagnosis and Treatment of Basal Cell Carcinoma: European Consensus–Based Interdisciplinary Guidelines.” *European Journal of Cancer* 118: 10–34.
- Pikabea, Aintzane, Jose Ramos, and Jacqueline Forcada. 2014. “Production of Cationic Nanogels with Potential Use in Controlled Drug Delivery.” *Particle and Particle Systems Characterization* 31(1): 101–9.
- Pour Khalili, Nazila, Maliheh Parsa, and Rasoul Moradi. 2022. “Polyvinyl Alcohol Nanofibers Encompass Chitosan/Tripolyphosphate Nanogels for Controlled Release of Gemifloxacin Antibiotic.” *Materials Today: Proceedings* 65: 2920–25. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.018>.
- Pourmanouchehri, Zahra et al. 2022. “Controlled Release of 5-Fluorouracil to Melanoma Cells Using a Hydrogel/Micelle Composites Based on Deoxycholic Acid and Carboxymethyl Chitosan.”

- International Journal of Biological Macromolecules* 206(January): 159–66.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.096>.
- Prausnitz, Mark R., and Robert Langer. 2008. "Transdermal Drug Delivery." *Nature Biotechnology* 26(11): 1261–68.
- Rahma, Annisa et al. 2016. "Intermolecular Interactions and the Release Pattern of Electrospun Curcumin-Polyvinyl(Pyrrolidone) Fiber." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 39(2): 163–73.
- Raimondi, Sara, Mariano Suppa, and Sara Gandini. 2020. "Melanoma Epidemiology and Sun Exposure." *Acta Dermato-Venereologica* 100(100-year theme Skin malignancies): 250–58.
- Ramos, Jose, Jacqueline Forcada, and Roque Hidalgo-Alvarez. 2014. "Cationic Polymer Nanoparticles and Nanogels: From Synthesis to Biotechnological Applications." *Chemical Reviews* 114(1): 367–428.
- Rantala, Elina S. et al. 2022. "Metastatic Uveal Melanoma: The Final Frontier." *Progress in Retinal and Eye Research* 90(April 2021).
- Rath, Goutam et al. 2016. "Development and Characterization of Cefazolin Loaded Zinc Oxide Nanoparticles Composite Gelatin Nano Fiber Mats for Postoperative Surgical Wounds." *Materials Science & Engineering C* 58: 242–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.050>.
- Ren, Xiaozhi et al. 2018. "An Aligned Porous Electrospun Fibrous Membrane with Controlled Drug Delivery – An Efficient Strategy to Accelerate Diabetic Wound Healing with Improved Angiogenesis." *Acta Biomaterialia* 70: 140–53.
- Reyes, Sebastián J. et al. 2020. "Actualización General de Inmunoterapia En Cáncer." *Revista médica de Chile* 148(7): 970–82.
- Rippa, Alexandra L., Ekaterina P. Kalabusheva, and Ekaterina A. Vorotelyak. 2019. "Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved." *Cells* 8(6).
- Roger, Mathilde et al. 2019. "Bioengineering the Microanatomy of Human Skin." *Journal of Anatomy* 234(4): 438–55.

- Rojas-Aguirre, Yareli, Karina Aguado-Castrejón, and Israel González-Méndez. 2016. "La Nanomedicina y Los Sistemas de Liberación de Fármacos: ¿la (r)Evolución de La Terapia Contra El Cáncer?" *Educacion Quimica* 27(4): 286–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
- Roointan, Amir et al. 2018. "Smart PH Responsive Drug Delivery System Based on Poly(HEMA-Co-DMAEMA) Nanohydrogel." *International Journal of Pharmaceutics* 552(1–2): 301–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.001>.
- Ruby, P. K., Shriram M. Pathak, and Deepika Aggarwal. 2014. "Critical Attributes of Transdermal Drug Delivery System (TDDS)- A Generic Product Development Review." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40(11): 1421–28.
- S., Bhaskar et al. 2010. "Multifunctional Nanocarriers for Diagnostics, Drug Delivery and Targeted Treatment across Blood-Brain Barrier: Perspectives on Tracking and Neuroimaging." *Particle and Fibre Toxicology* 7: 1–25. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L358680937%5Cnhttp://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/3%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-7-3>.
- Saginala, Kalyan et al. 2021. "Medical Sciences Epidemiology of Melanoma." : 1–9. <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>.
- Santos, Salomé, Bruno Medronho, Tiago Santos, and Filipe E Antunes. 2013. *Amphiphilic Molecules in Drug Delivery Systems*.
- Schmalz, Alexander, Mathias Hanisch, Holger Schmalz, and Axel H.E. Müller. 2010. "Double Stimuli-Responsive Behavior of Linear and Star-Shaped Poly(N,N-Diethylaminoethyl Methacrylate) in Aqueous Solution." *Polymer* 51(6): 1213–17.
- Seigneuric, R et al. 2010. "Seigneuric2010." : 640–52.
- Serrano-Medina, A., J. M. Cornejo-Bravo, and A. Licea-Claverie. 2012. "Synthesis of PH and Temperature

- Sensitive, Core-Shell Nano/Microgels, by One Pot, Soap-Free Emulsion Polymerization.” *Journal of Colloid and Interface Science* 369(1): 82–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.045>.
- Serrano-Medina, Aracely et al. 2018. “Temperature- and PH-Sensitive Core–Shell Nanogels as Efficient Carriers of Doxorubicin with Potential Application in Lung Cancer Treatment.” *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 67(1): 20–26.
- Sherly, M. Caroline Diana, Rekha MR, and Harikrishnan V.S. 2020. “Cationised Dextran and Pullulan Modified with Diethyl Aminoethyl Methacrylate for Gene Delivery in Cancer Cells.” *Carbohydrate Polymers* 242(November 2019): 116426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116426>.
- Shetty, Karishma, Ayush Bhandari, and Khushwant S. Yadav. 2022. “Nanoparticles Incorporated in Nanofibers Using Electrospinning: A Novel Nano-in-Nano Delivery System.” *Journal of Controlled Release* 350(May): 421–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.035>.
- Shi, Yang, Roy van der Meel, Xiaoyuan Chen, and Twan Lammers. 2020. “The EPR Effect and beyond: Strategies to Improve Tumor Targeting and Cancer Nanomedicine Treatment Efficacy.” *Theranostics* 10(17): 7921–24.
- Su, Dandan et al. 2020. “Cationic Dynamic Covalent Polymers for Gene Transfection.” *Journal of Materials Chemistry B* 8(41): 9385–9403.
- Sun, Weiyi et al. 2020. “Intake of Furocoumarins and Risk of Skin Cancer in 2 Prospective US Cohort Studies.” *Journal of Nutrition* 150(6): 1535–44. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa062>.
- Sydow, Steffen et al. 2019. “Layer-by-Layer Deposition of Chitosan Nanoparticles as Drug-Release Coatings for PCL Nanofibers.” *Biomaterials Science* 7(1): 233–46.
- Tímár, József, and Andrea Ladányi. 2022. “Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction.” *International Journal of Molecular Sciences* 23(10).
- Torres-Martinez, Erick José et al. 2018. “A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System:

- Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices." *Current Drug Delivery* 15(10): 1360–74.
- Torres-Martínez, Erick José et al. 2019. "Drugs Loaded into Electrospun Polymeric Nanofibers for Delivery." *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 22(1): 313–31.
- Trager, Megan H. et al. 2020. "Advances in Prevention and Surveillance of Cutaneous Malignancies." *American Journal of Medicine* 133(4): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.10.008>.
- Tuğcu-Demiröz, Fatmanur et al. 2021. "Development and Characterization of Chitosan Nanoparticles Loaded Nanofiber Hybrid System for Vaginal Controlled Release of Benzydamine." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 161(February).
- Urlick, Mary Ellen et al. 2011. "Enhancement of 5-Fluorouracil-Induced in Vitro and in Vivo Radiosensitization with MEK Inhibition." *Clinical Cancer Research* 17(15): 5038–47.
- Vargas-Molinero, Hever Yuritzky et al. 2023. "Hybrid Systems of Nanofibers and Polymeric Nanoparticles for Biological Application and Delivery Systems." *Micromachines* 14(1).
- Vathaluru, Shruthi et al. 2017. "Sequel of MgO Nanoparticles in PLACL Nano Fibers for Anti-Cancer Therapy in Synergy with Curcumin / β -Cyclodextrin." *Materials Science & Engineering C* 71: 620–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.050>.
- Velasco Barraza, R. D. et al. 2016. "Designing a Low Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course." *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica* 37(1): 7–16.
- Viegas, JRS, Rosa J Praca, Bentley Mf, and M Vitoria L B Bentley. 2018. "Development and Validation of a HPLC Method for 5-Fu Quantification Following In Vitro Skin Permeation Assay." 2(1): 1–12.
- Villarreal-Gómez, Luis Jesús et al. 2018. "Polymeric Advanced Delivery Systems for Antineoplastic Drugs: Doxorubicin and 5-Fluorouracil." *E-Polymers* 18(4): 359–72.
- . 2021. "Antimicrobial Effect of Electrospun Nanofibers Loaded with Silver Nanoparticles: Influence of Ag Incorporation Method." *Journal of Nanomaterials* 2021.
- Villarreal-Gómez, Luis Jesús, José Manuel Cornejo-Bravo, Ricardo Vera-Graziano, and Daniel Grande.

2016. "Electrospinning as a Powerful Technique for Biomedical Applications: A Critically Selected Survey." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 27(2): 157–76.
- Vlachopoulos, Antonios et al. 2022. "Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances." *Pharmaceutics* 14(2): 1–37.
- Vodenkova, Sona et al. 2020. "5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines in Colorectal Cancer: Past, Present and Future." *Pharmacology and Therapeutics* 206: 107447.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>.
- Wang, Jing et al. 2018. "Engineering PCL/Lignin Nanofibers as an Antioxidant Scaffold for the Growth of Neuron and Schwann Cell." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 169(April): 356–65.
- Wang, Nü, and Yong Zhao. 2018. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications Coaxial Electrospinning*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-51270-1.00005-4>.
- Wigmore, Peter M. et al. 2010. "Effects of 5-FU." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 678: 157–64.
- Wu, Shuping, Kanghui Li, Weijian Shi, and Jiawei Cai. 2022. "Chitosan/Polyvinylpyrrolidone/Polyvinyl Alcohol/Carbon Nanotubes Dual Layers Nanofibrous Membrane Constructed by Electrospinning-Electrospray for Water Purification." *Carbohydrate Polymers* 294(June): 119756.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119756>.
- Xu, Peisheng et al. 2006. "Anticancer Efficacies of Cisplatin-Releasing PH-Responsive Nanoparticles." *Biomacromolecules* 7(3): 829–35.
- Zambrano-Román, Marianela et al. 2022. "Non-Melanoma Skin Cancer: A Genetic Update and Future Perspectives." *Cancers* 14(10).
- Zhang, Bin et al. 2020. "Measurement of Adhesion of in Situ Electrospun Nanofibers on Different Substrates by a Direct Pulling Method." *Advances in Materials Science and Engineering* 2020.
- Zhang, Jinrong et al. 2023. "Deep - Learning - Based Survival Prediction of Patients with Lower Limb

Melanoma." *Discover Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12672-023-00823-y>.

Zhou, Hao, Sujit Modi, and Pratim Biswas. 2022. "Controlled Synthesis of Charged Lignin Nanocarriers by Electro spray." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 648(March): 129314. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129314>.

Zhu, Meiling et al. 2018. "Bioadhesive Polymersome for Localized and Sustained Drug Delivery at Pathological Sites with Harsh Enzymatic and Fluidic Environment via Supramolecular Host–Guest Complexation." *Small* 14(7): 1–10.

ANEXOS

ANEXO 1

Tijuana, B.C. a 20 de abril de 2023.

Asunto: Apoyo en Proyecto de Investigación.

Dr. Osmar Leopoldo Sanmiguel Lugo y Dr. Leopoldo Sanmiguel Arrambid

Beauty Hospital

Erasmus Castellanos Q. 1874-Local 203, Zona Urbana Rio Tijuana, 22010 Tijuana, B.C.

PRESENTE

Estimados Dr. Osmar Sanmiguel y Dr. Leopoldo Sanmiguel, me permito a través de la presente solicitar de la manera más atenta su apoyo y colaboración para donar piel humana extirpada, para el presente proyecto de investigación:

I.- FICHA DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

1. TÍTULO DEL PROYECTO:

Sistema de liberación transdermal cargado de nanopartículas, para administración tópica de 5-FU en melanoma

2. INSTITUCIÓN RESPONSABLE:

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California.

3. NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

M.C.S. Hever Yuritzzy Vargas Molinero

Alumna de Doctorado en Ciencias

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

4. NOMBRE(S) DE INVESTIGADOR(ES) ASOCIADO(S)

Dra. Aracely Serrano Medina.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

CODIRECTOR DE TESIS

5. SEDE DEL PROYECTO

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

6. FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Recursos del Departamento de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

7. DESCRIPCION ESPECIFICA DE USO

La piel humana extirpada será utilizada para evaluar la liberación de 5-Fluorouracilo a partir de nanopartículas poliméricas, separando la epidermis viable del tejido graso y utilizando celda Franz para estudiar la permeabilidad de los fármacos en la piel para aplicaciones tópicas.

La piel humana extirpada será manejada con estricta discreción y no podrá ser utilizada por el investigador para otros fines que no sean los convenidos en este estudio de investigación, así como todos los procedimientos metodológicos que se lleven a cabo serán en función de salvaguardar la integridad de cada uno de los sujetos, en estricto apego a la Ley general de Salud en materia de Investigación.

M.C.S. Hever Yuritzzy Vargas Molinero

Alumna de Doctorado en Ciencias

Dra. Aracely Serrano Medina

Director de Tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Codirector de Tesis

ANEXO 2

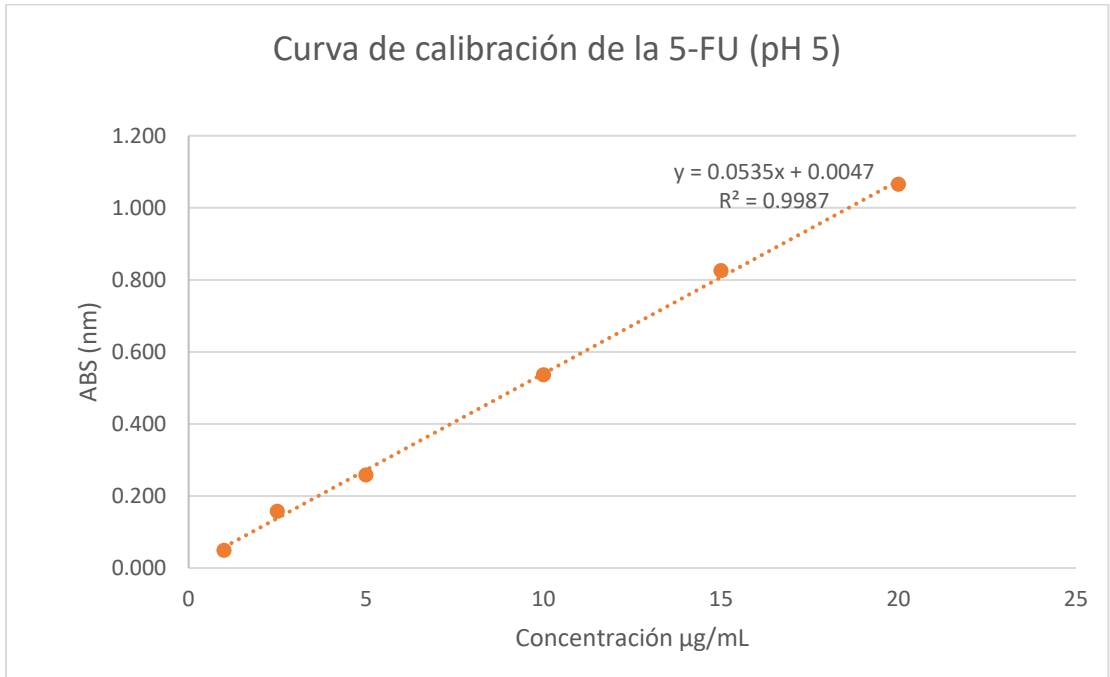
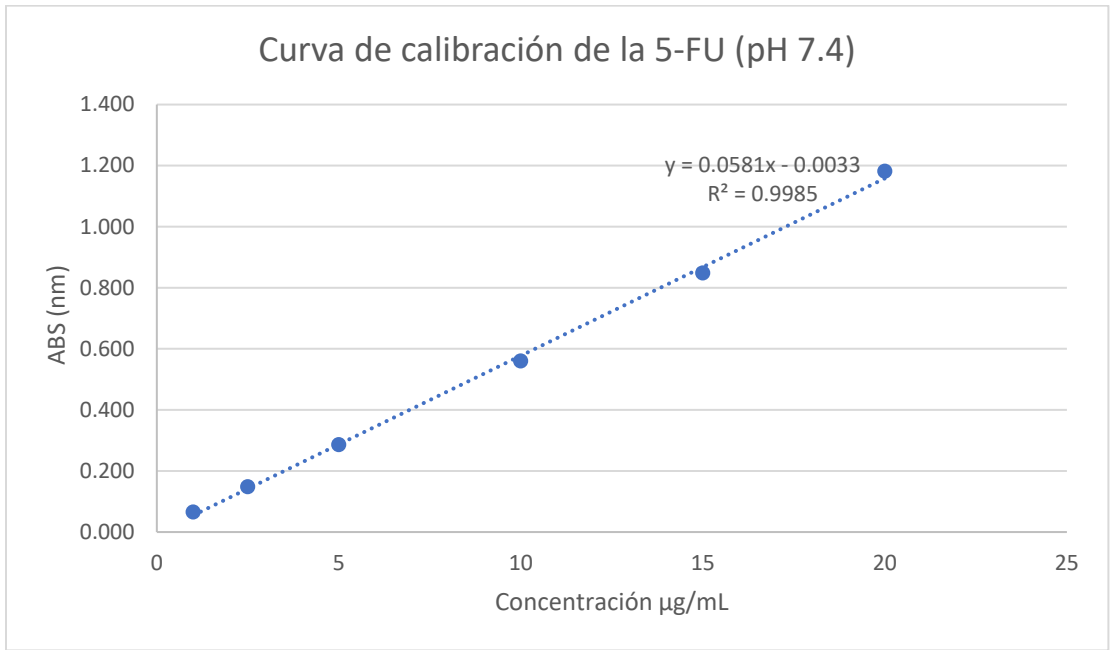
Valores de liberación pH 5

Tiempo horas	Control	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0.25	0.99(0.217)	0.109	0.102(0.235)	0.106(0.247)
0.5	0.109	0.140	0.129(0.252)	0.180
0.75	0.118	0.180	0.190	0.220
1	0.170	0.191	0.200	0.174
2	0.169	0.223	0.208	0.168
4	0.175	0.201	0.202	0.213
8	0.189	0.198	0.178	0.221
12	0.195	0.211	0.183	0.189
24	0.189	0.201	0.172	0.206
36	0.192	0.181	0.182	0.206

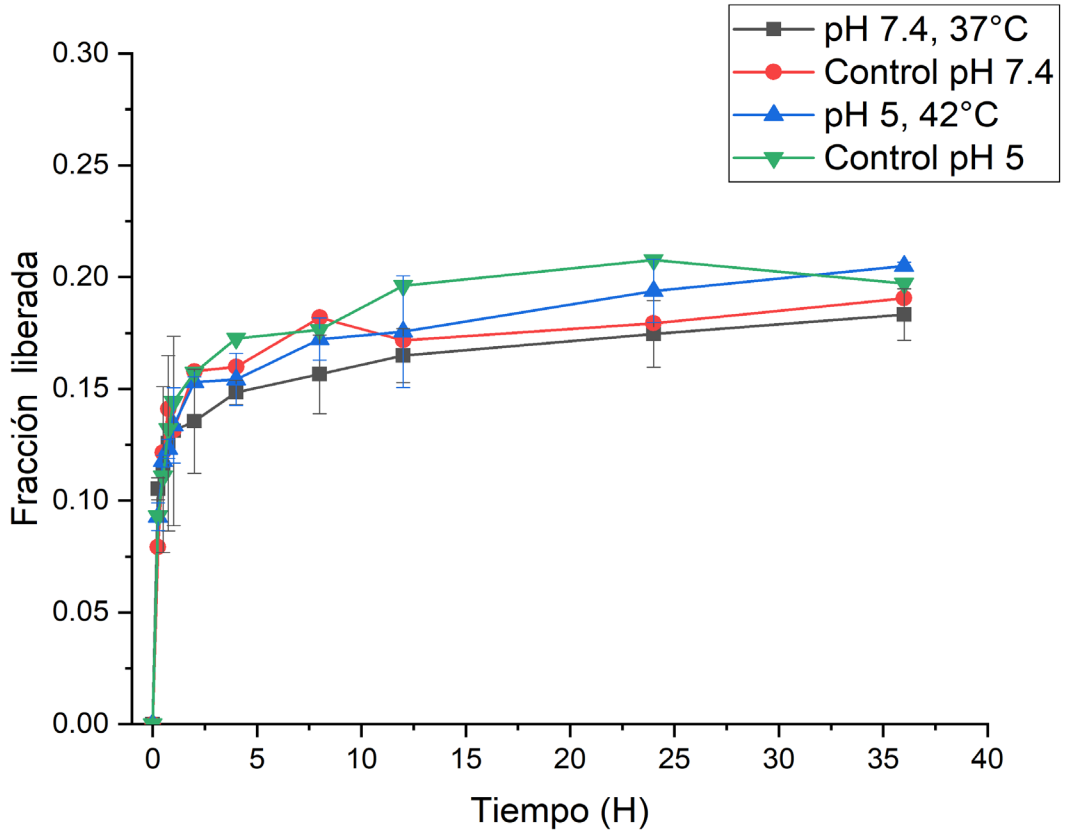
Valores de liberación pH 7.4

Tiempo horas	Control	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0.25	0.181	0.242	0.235	0.247
0.5	0.257	0.264	0.252	0.180
0.75	0.271	0.284	0.190	0.220
1	0.216	0.274	0.200	0.174
2	0.251	0.223	0.208	0.168
4	0.225	0.201	0.202	0.213
8	0.249	0.198	0.178	0.221
12	0.195	0.211	0.183	0.189
24	0.189	0.201	0.172	0.206
36	0.192	0.181	0.182	0.206

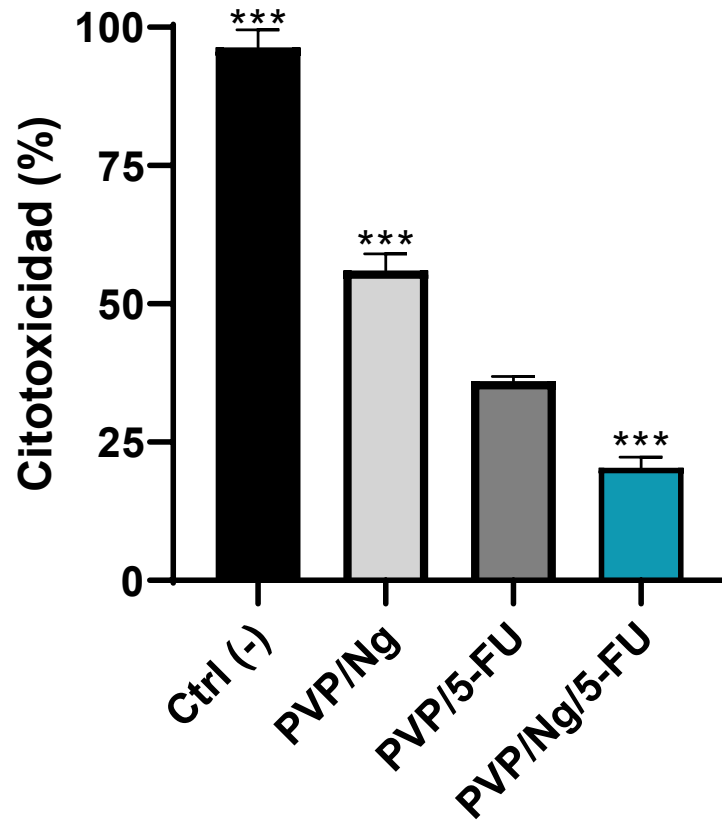
ANEXO 3



ANEXO 4



ANEXO 5



ANEXO 6

ABS = y

y = 0.148

Peso total de liofilizado = 109mg

x = ABS +Intercepto / Pendiente

x = 0.148 - 0.018 / 0.0499= 2.6052

Dilución = Disolvente / Muestra

Dilución de la muestra leída

Muestra cargada 1mg en 1mL etanol

esto se diluye de la siguiente manera

Dilución = (3.9mL) 4mL etanol/ 0.1 ml muestra cargada = 40 factor de dilución

Dilución de la muestra leída:

Dilución = Disolvente / Muestra

Dilución = 4ml / 0.1 ml = 40 factor de dilución

$x = 2.6052 * 40 = \mu\text{g}$

$104.2084 \mu\text{g} / 1000 = 0.1042 \text{ mg}$

1 mg --- 0.1042

109 --- x x = 11.3587 mg

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

$\text{CCF} = 11.3587\text{mg} / 109\text{mg} * 100 = 10.42 \%$

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

$\text{EC} = 11.3587\text{mg} / 30\text{mg} * 100 = 37.8623 \%$

Para tener 1mg de fármaco en la muestra se necesitan 10.5mg de nanogeles