

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“Síntesis de nanogeles de N-isopropilacrilamida y
carboxialquilmecrilamidas, y su aplicación en la liberación de
fármacos”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. CLAUDIA DANIELA BECERRA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ARACELY SERRANO MEDINA

CODIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

TIJUANA, B.C.

JUNIO 2017

HOJA DE APROBACIÓN

Universidad Autónoma de Baja California FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 248

Tijuana, B. C., a 29 de mayo de 2018


C. Claudia Daniela Becerra Sánchez
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

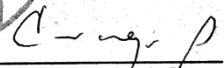
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

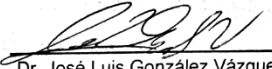
Es propuesto, por los C. Dres. Aracely Serrano Medina y José Manuel Cornejo
Bravo

Quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente,
referido al tema "Síntesis de nanogeles de N-isopropilacrilamida y
carboxialquilmetacrilamidas, y su aplicación en la liberación de fármacos"
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- TEORIA GENERAL
- III.- EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS


Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Sub-Director Secretario


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



DEDICATORIA

El siguiente trabajo está dedicado principalmente para mi familia, pero en especial para mis padres, Luis y Lucina que siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado, de manera incondicional, y siempre han estado para mí, apoyándome y aconsejándome, además de brindarme su amor y comprensión a lo largo de la vida académica y personal, los amo.

También quiero dedicarle este trabajo a mi primo Christian Sánchez (q.e.p.d.), que fue mi inspiración diaria para conseguir este trabajo y dar lo mejor de mí constantemente.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Hoja de aprobación	I
Dedicatoria	II
Contenido	III
Lista de figuras	V
Lista de ecuaciones	VII
Lista de ecuaciones	VIII
Agradecimientos	IX
Reconocimientos institucionales	XI
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	2
I.2 Justificación	3
I.3 Objetivo general	4
I.4 Objetivos específicos	4
I.5 Hipótesis	4
CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL	5
II.1 Sistemas de liberación de fármacos	6
II.2 Hidrogeles y nanogeles	6
II.3 Tipos de polimerización	7
II.3.1 Polimerización por precipitación	8
II.3.2 Polimerización por dispersión	8
II.3.3 Polimerización por emulsión sin detergente	8
II.4 Nanogeles inteligentes	9
II.4.1 Nanogeles termosensibles	9
II.4.2 Nanogeles sensibles a pH	11
II.5 Cáncer	12
II.5.1 Tumores	14
II.5.2 Efecto potenciado de permeabilidad y retención	15
II.6 Sistema de liberación para anticancerígenos	15
II.6.1 5-Fluorouracilo	17
CAPÍTULO III EXPERIMENTAL	19
III.1 Generalidades	20

III.2	Purificación de NIPAAm por recristalización	21
III.3	Síntesis de monómeros carboxialquilmetacrilamidas (CAM's)	22
III.4	Caracterización de los monómeros	23
III.4.1	Cromatografía de capa fina	23
III.4.2	Espectrofotometría de infrarrojo	23
III.4.3	Resonancia magnética nuclear de protón	24
III.5	Síntesis de sal potásica de monómeros carboxialquil- Metacrilamidas (CAM's)	24
III.6	Síntesis de nanogeles de NIPAAm: CAM	25
III.7	Liofilización y reconstitución de nanogeles	26
III.8	Técnicas de caracterización para nanogeles de NIPAAm: CAM	27
III.8.1	Dispersión de luz dinámica	27
III.8.2	Espectrofotometría de infrarrojo	27
III.8.3	Determinación del porcentaje de ácido	27
III.8.4	Potencial Z	28
III.8.5	Microscopía electrónica de barrido	28
III.9	Cargado del fármaco 5-Fluorouracilo (5-FU)	29
III.10	Liberación del fármaco 5-Fluorouracilo (5-FU)	29

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES 31

IV.1	Síntesis de monómeros carboxialquilmetacrilamidas (CAM's)	32
IV.2	Caracterización de monómeros	32
IV.2.1	Cromatografía de capa fina	33
IV.2.2	Espectrofotometría de infrarrojo	33
IV.2.3	Resonancia magnética nuclear de protón	35
IV.3	Síntesis de sal potásica de monómero carboxialquil- Metacrilamidas (CAM's)	36
IV.4	Síntesis de nanogeles de NIPAAm: CAM	37
IV.5	Caracterización de nanogeles NIPAAm: CAM	37
IV.5.1	Diámetro hidrodinámico de nanogeles purificados en diálisis	38
IV.5.2	Diámetro hidrodinámico de nanogeles copolimerizados de NIPAAm: CAM	40
IV.5.3	Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles	41
IV.5.4	Efecto de la temperatura y pH en los nanogeles co- Polimerizados con NIPAAm:CAM	44
IV.5.5	Espectrofotometría de infrarrojo	51
IV.5.6	Determinación del porcentaje de ácido	53
IV.5.7	Potencial Z	54
IV.5.8	Microscopía electrónica de barrido	55
IV.6	Cargado de nanogeles con 5-Flurouracilo (5-FU)	56

IV.7	Liberación del fármaco 5-Fluorouracilo (5-FU)	57
CAPÍTULO V	CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO VI	REFERENCIAS	62
CAPÍTULO VII	ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

No.	TÍTULO	PÁGINA
1.	Estructuras químicas de NIPAAm y carboxialquilmecrilatos	2
2.	Representación de hinchamiento de nanogel	10
3.	Representación de sistema de liberación intracelular para anticancerígenos	16
4.	Síntesis para la obtención de carboxialquilmecrilamidas	22
5.	Síntesis para la obtención de sal potásica de carboxialquilmecrilamidas	24
6.	Monómeros obtenidos a partir de síntesis de carboxialquilmecrilamidas	32
7.	Espectro de infrarrojo de monómeros M5, M7 y M10	33
8.	Espectro de resonancia magnética nuclear de protón en M7	35
9.	Sales potásicas obtenidas a partir de monómeros M5, M7 y M10	37
10.	Diámetro hidrodinámico de nanogeles de NIPAAm:M10 purificados	38
11.	Diámetro hidrodinámico de nanogeles de NIPAAm:CAM en forma de sal al 15%	39
12.	Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:M5	41
13.	Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:M7	42
14.	Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:M10	43
15.	Efecto de temperatura en el tamaño de nanogeles NIPAAm y NIPAAm:CAM en agua	45
16.	Efecto de temperatura en tamaño de nanogeles de NIPAAm:M5 y NIPAAm:M5K en pH de 3 a 9	46
17.	Efecto de temperatura en tamaño de nanogeles de NIPAAm:M7 y NIPAAm:M7K en pH de 3 a 9	48
18.	Efecto de temperatura en tamaño de nanogeles de NIPAAm:M10 y NIPAAm:M10K en pH de 3 a 9	49
19.	Espectro de infrarrojo de geles NIPAAm y micro/nanogeles de NIPAAm:M7 y NIPAAm:M7K	51
20.	FESEM de nanogeles (A) NIPAAm:M10, (B) NIPAAm:M10K	55
21.	Liberación de 5-Fluorouracilo a 25° C y a 37° C	57

LISTA DE TABLAS

No.	TÍTULO	PÁGINA
1.	Concentraciones utilizadas de NIPAAm y carboxialquilmeta- crilamidas	25
2.	Señales características de grupos funcionales encontrados en M5, M7 y M10 Porcentajes de rendimientos obtenidos en liofilizados de	34
3.	nanogeles	40
4.	Temperaturas de transición de nanogeles NIPAAm:CAM	47
5.	Señales características de grupos funcionales encontrados en PNIPAAm y nanogeles NIPAAm:M7 y NIPAAm:M7K	52
6.	Porcentaje de ácido obtenido en nanogeles NIPAAm:CAM	54
7.	Potencial Z de microgeles y nanogeles de NIPAAm y CAM's	55

LISTA DE ECUACIONES

No.	TÍTULO	PÁGINA
1.	Fórmula para la obtención de gramos necesarios de hidróxido de potasio	24
2.	Fórmula para la obtención del porcentaje de ácido en nanogeles	53

AGRADECIMIENTOS

Uno siempre cree que todo depende de uno mismo para la realización o culminación de un proyecto, pero siempre se necesita fuerza y coraje generada a través de personas que brindan su apoyo. Quiero agradecer primeramente a mis padres Luis Daniel Becerra Ponce y María Lucina Sánchez León, primeramente, por darme la vida y por siempre apoyarme en todas las decisiones, siempre tener apoyo de aliento y no dejarme caer por más pesado que sea el camino y ser esa luz en mi vida, no tengo palabras realmente para agradecerles tanto amor y tanto apoyo a lo largo de mi vida. También quiero agregar a mis hermanos Luis Daniel y Leonardo Miguel Becerra Sánchez, son una parte importante de mi vida personal y profesional, siempre tienen un buen consejo o un buen abrazo para recargar energías y continuar un proyecto.

Quiero agradecer a la Dra. Aracely Serrano Medina y al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente en el proyecto, estar presente para cualquier duda, para aclararme ideas y sobre todo, por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir en familia, son un ejemplo de profesionalismo y dedicación que siempre tendré presente. Muchas gracias por exigirme a que diera siempre más de lo que me creía capaz, retarme y enseñarme tantas cosas, simple y sencillamente no pude caer en mejores manos y en mejor laboratorio.

También quiero agregar a la M.C. Kenia Palomino Vizcaíno y al Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla, por ser una parte importante de mi aprendizaje, porque constantemente estuvieron para enseñarme técnicas, manejo de equipos, reacciones, pero sobre todo por darme su amistad y apoyo desde el primer día

que entré al laboratorio; agrego además a todo el equipo del laboratorio de Biofarmacia: Ayla Veá, Paola Cervantes, Noemí Arellano, Alondra Montaña, Hernán Carrillo, y sobre todo a Yuritzzy Vargas e Iván Rodríguez, ya que nos tocó aprender todo juntos e igual siempre apoyándonos, gracias a todos por hacer tan ameno el trabajo. Gracias a mis compañeros de posgrado: Carolina Dodier, por ser una amiga tan leal y divertida, por tantas horas de pláticas y consejos; Erick Torres, gracias por tu ayuda y paciencia; Analy Quiñonez, Ulises Villaloba, Rita Zurita, sencillamente gracias por hacer tan amena la convivencia en posgrado. Gracias también a Patricia Velasco, ella siempre facilitándonos todo y ayudándonos, además de esos abrazos tan sinceros y palabras de aliento.

Finalmente, pero no menos importante, quisiera agradecer a mi familia (tíos, primos, sobrinos), que nunca dejaron de creer en mí y siempre estuvieron conmigo, en todo mi crecimiento personal y profesional, y sobre todo por hacerme notar su orgullo hacia mí; y a mis amigos fuera de la escuela: Iveth González, Marisol Cerda, Esteban Muro, Stephanie Paredes, Janet Cíntora, Carlos Vázquez y Esteban Cíntora, por siempre estar para mí y darme palabras de aliento por más crítica que sintiera la situación, por todos aquellos cafés y comidas que ayudaban a despejarme para agarrar pilas; y un agradecimiento especial a Cristian Ramírez, ya que no solo me apoyó con palabras, sino que estuvo siempre aclarándome dudas con mucha paciencia y siendo incondicional cada que lo necesitaba.

Muchas gracias a todos por hacer esto posible.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Aracely Serrano Medina, y codirección del Dr. José Manuel Cornejo Bravo, en el laboratorio de Biofarmacia en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, dentro del programa de **Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI)** presente en la **Universidad Autónoma de Baja California (UABC)**.

Se agradece la confianza y el apoyo de la Universidad, además del apoyo otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** para la realización de estudios de posgrado en la convocatoria No. **291137**.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1 ANTECEDENTES

En 2016, Castro-Vidal y colaboradores, sintetizaron nanogeles con carboxialquilmetacrilatos, en proporciones de 5, 10 y 15% utilizando el método de polimerización por dispersión. La parte experimental se llevó a cabo utilizando NIPAAm y como comonómeros las CAM en concentraciones previamente mencionadas. Después de hacer la polimerización, por dispersión, las nanopartículas fueron analizadas por dispersión de luz dinámica (DLS) para determinar tamaños y transiciones con la temperatura (Castro-Vidal et al., 2016).

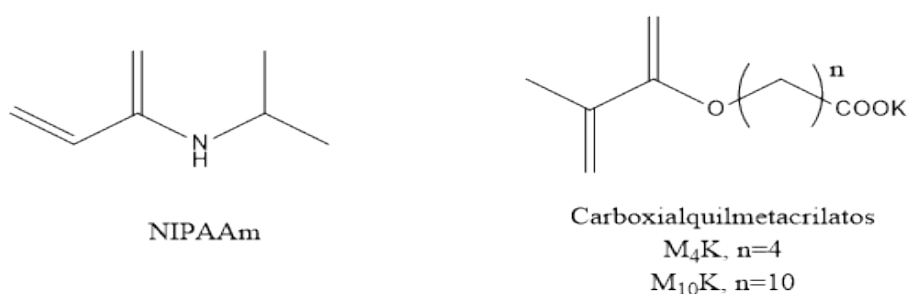


Figura 1. Estructuras químicas de NIPAAm y carboxialquilmetacrilatos.

Los resultados que se pudieron observar fueron que entre más sal de M4 se incorporaba en la reacción para la síntesis de microgeles, decrecían su tamaño, pero a la vez bajaba levemente su temperatura de transición. La disminución de tamaño indicó que la sal actuaba de surfactante en la reacción. Por otra parte, al momento de utilizar la sal de M11, aumentó su poder de surfactante creando nanopartículas de hasta 27 nm, pero como consecuencia se pierde la temperatura de transición, ya que el tamaño no se veía afectado respecto a la temperatura (Castro-Vidal et al., 2016).

Finalmente, se pudo concluir que sí era posible crear geles sensibles a pH y temperatura utilizando NIPAAm y M4K, ya que con esta combinación era posible tener microgeles más pequeños que utilizando solamente geles de

NIPAAm; sin embargo, en el caso de las partículas de M10K con NIPAAm, se obtenían nanopartículas pero por ser más hidrofóbica, disminuyó la temperatura de transición aunque también se observa que sirve como estabilizador en la síntesis (Castro-Vidal et al., 2016).

I.2 JUSTIFICACIÓN

Los motivos que conllevan a realizar esta investigación se centran en que en la actualidad los medicamentos deben adaptarse a las necesidades que tenga la sociedad. Estas nanopartículas están enfocadas en el tratamiento contra cáncer debido a que los fármacos existentes traen consigo muchos efectos secundarios haciendo más difícil la eficacia del tratamiento y la erradicación de células cancerígenas. La idea del proyecto es que se tenga una más acertada liberación de fármaco, aprovechando que el crecimiento acelerado de las células tumorales trae consigo cambios en su fisiología creando fenestras entre ellas, y esto facilitaría un extravasado de nanopartículas cargadas a la zona tumoral, haciendo una liberación directa a células cancerígenas.

Las células tumorales, al ser creadas por proliferación agresiva, cuentan con una anatomía y fisiología diferente a un tejido normal, ya que cuenta con fenestras entre células endoteliales, lo cual facilita el extravasado de moléculas, por lo cual facilitaría una acumulación de nanopartículas cargadas en la zona tumoral, haciéndose una liberación más acertada.

Se pretende que las nanopartículas inteligentes sintetizadas presenten un tamaño considerablemente pequeño pero que tenga una transición de pH y temperatura, para que pueda actuar en un sitio específico creándose un sistema

de liberación de fármaco más específico y acertado para la liberación del anticancerígeno.

I.3 OBJETIVO GENERAL.

Sintetizar una serie de nanogeles de NIPAAm copolimerizados con carboxialquilmecrilamidas y caracterizar sus propiedades de hinchamiento y aplicación a la liberación sostenida de fármacos antineoplásicos.

I.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Sintetizar una serie de carboxialquilmecrilamidas con 5, 7 y 10 metilenos en su cadena lateral.
2. Preparar la sal de potasio de las carboxialquilmecrilamidas.
3. Sintetizar nanogeles de NIPAAm con las CAM en forma de sal y como ácido, en tres diferentes proporciones (5%, 10% y 15%)
4. Estudiar el efecto de pH y las sales en las temperaturas de transición de los nanogeles.
5. Cargar los nanogeles con 5-Fluorouracilo y estudiar su liberación.

I.5 HIPÓTESIS.

Es posible preparar nanogeles sensibles al pH y la temperatura, mediante la copolimerización de NIPAAm y carboxialquilmecrilamidas (CAM), los cuales tienen aplicaciones en la liberación de fármacos.

CAPÍTULO II

TEORÍA GENERAL

II.1 SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Para optimizar la farmacoterapia se requieren sistemas de liberación controlada (DDS) (Soares et al., 2016). Para poder desarrollar un transportador adecuado es necesario conocer cómo actúa el fármaco que se desea manipular: cómo se incorpora y libera, su estabilidad, vida del transportador a utilizar, biocompatibilidad, cómo llega al sitio de acción y su funcionalidad (Soares et al., 2016). El objetivo de un DDS es lograr una fácil administración, generar una acumulación focalizada, minimizar efectos adversos y optimizar efectos terapéuticos (Q. Hu et al., 2016; Pan et al., 2016; Wang et al., 2016). Se ha sugerido que para poder mejorar la administración de fármacos, se llegan a utilizar diversos materiales, donde se incluyen: polímeros sintéticos, lípidos, materiales orgánicos y andamios, entre otros (Q. Hu et al., 2016).

II. 2 HIDROGELES Y NANOGELES

La polimerización con monómeros polifuncionales trae como producto un hidrogel. Un hidrogel es una red tridimensional de cadenas poliméricas entrecruzadas que no puede disolverse en agua o fluidos biológicos (Lee & Yeh, 2005; Norouzi et al., 2016). Generalmente el hinchamiento en el volumen del gel se ve alterado por diversos factores en donde se expone: pH, temperatura, fuerza iónica y campo eléctrico, por lo tanto, se convierten en buenos candidatos para la liberación de fármacos. Una de las grandes ventajas que se encuentra con esta formulación polimérica, es que al hincharse, no pierden su estructura interna, lo cual hace que se asemeje a un tejido blando (Lee & Yeh, 2005; Miao et al., 2016; Soni & Yadav, 2016), además de que los hidrogeles presentan una alta porosidad y biocompatibilidad (Miao et al., 2016).

Los nanogeles, son básicamente nanoversiones de los hidrogeles, que abarcan diámetros de 20 a 200 nm, pero traen consigo propiedades únicas, tales como: alta porosidad, capacidad de absorción en agua, estabilidad y funcionalidad. Gracias a sus características, los nanogeles encuentran varias ventajas para la liberación de fármacos, ya que, por su tamaño pueden ser manipuladas para evitar una depuración rápida por el sistema retículo endotelial, además de que el fármaco puede cargarse al nanogel y así poder atravesar barreras fisiológicas para llegar a células afectadas, aumentando la eficacia terapéutica y reduciendo efectos adversos (Sultana et al., 2013). Una gran variedad de nanogeles se ha explotado para aplicaciones en la administración de nuevos fármacos controlados mediante señales magnéticas, iónicas y térmicas para su liberación (Rejinold et al., 2014).

La formulación química de nanogeles ha traído consigo una gran gama de estructuras poliméricas inteligentes, siendo útiles para la encapsulación, entrega y liberación de fármacos de bajo y alto peso molecular; con esto se proporciona una nueva familia con un alto potencial en la liberación de fármacos, terapia genética y herramientas de tejidos (Mauri et al., 2016).

II.3 TIPOS DE POLIMERIZACIÓN

Existen diversos métodos para lograr la síntesis de nanogeles, en los cuales se encuentran: emulsión heterogénea agua-aceite, método micelar reversa, emulsificación de membrana, polimerización heterogénea por radical libre, polimerización por precipitación, polimerización por dispersión, por mencionar algunas (Sultana et al., 2013).

II.3.1 Polimerización por precipitación

Este tipo de polimerización consiste en una primera etapa de mezcla homogénea, y la iniciación y polimerización en ese medio homogéneo. En este método es necesaria la utilización de un entrecruzante para poder crear un “entrecruzamiento” entre las cadenas de los polímeros formados para poder aislarlos entre ellos. Como consecuencia, se obtienen polímeros irregulares, con una polidispersión alta (Sultana et al., 2013).

II.3.2 Polimerización por dispersión

La polimerización por dispersión consiste en tener una fase orgánica continua, donde la mayoría de los reactivos (monómeros, entrecruzante e iniciador) sean solubles en este medio. La polimerización inicia de manera homogénea, sin embargo, los polímeros se vuelven insolubles en el medio continuo, lo que conlleva a una dispersión estable de partículas poliméricas, con la ayuda de estabilizadores coloidales (Sultana et al., 2013).

II.3.3 Polimerización por emulsión sin detergente

La polimerización por emulsión sin detergente es un método óptimo para la realización de partículas monodispersas, y favorece la disminución de impurezas. Una polimerización realizada en medio acuoso se estabiliza por interacciones electrostáticas (Shibuya et al., 2014). Este tipo de polimerización trae consigo una gran ventaja, ya que no requieren la eliminación del surfactante adsorbido en las partículas, además se puede mejorar la estabilidad de las partículas con la adición de polímeros hidrofóbicos (Sakai, 2008).

Cabe mencionar que el uso de una temperatura elevada en este proceso es fundamental para originar radicales libres, por la descomposición del persulfato del iniciador (Pelton, 2000).

II.4 NANOGELES INTELIGENTES

Los nanogeles se clasifican en dos grandes grupos: geles sin respuesta y geles estímulo responsivos; los primeros son aquellos que solo se hinchan y deshinchán en presencia de agua. Los nanogeles estímulo responsivos son aquellos que al estar expuestos en diversos factores como pH, temperatura, campo iónico o campo magnético, presentan un cambio (Sultana et al., 2013). A este tipo de nanogeles que presentan una respuesta a estímulos se le llaman “inteligentes” (Palomino et al., 2015). Dentro de los nanogeles “inteligentes”, se encuentran los termosensibles; éstos se caracterizan por presentar una fase de separación en agua cuando se llega a una cierta temperatura, esta temperatura es conocida como temperatura de transición (LCST). Dentro de la gama de polímeros termosensibles, el más estudiado es Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) (Asadi & Khoee, 2016).

II.4.1 Nanogeles termosensibles

El primer reporte de síntesis de PNIPAAm y su caracterización como polímeros termosensibles, fue en 1986 por Pelton y Chibante, quienes la sintetizaron a partir de la polimerización por precipitación (Ballauff & Lu, 2007).

La PNIPAAm tiene una temperatura de transición de 30 a 32° C, lo cual indica que pierde sus propiedades hidrofílicas para volverse hidrofóbico en medio acuoso cuando la temperatura está sobre su LCST (Palomino et al., 2015), cabe señalar que éste fenómeno es reversible, al bajar de nuevo la temperatura,

éste polímero va a volver a su estructura previa, donde es hidrofílica y presenta hinchamiento (Castro-Vidal, D.a., et al., 2016). Debido a que su temperatura es muy cercana a la temperatura corporal se convierte en un excelente candidato para la liberación de fármacos. Este polímero tiende hincharse de 10 a 1000 veces sin perder su estructura interna, mientras va cambiando la temperatura; sin embargo, debido a estos cambios en su hinchamiento, se va perdiendo la fuerza mecánica y se va modificando su permeabilidad y diámetro en la porosidad (Asadi & Khoee, 2016; Bearat et al., 2012; Minghong et al., 1999; Rejinold et al., 2014; Serrano-Medina et al., 2012; Setiyorini et al., 2012).

La temperatura de transición de PNIPAAm puede ser alterada mediante la incorporación de diversos comonómeros dependiendo de la aplicación. La conjugación con monómeros hidrofóbicos trae consigo una disminución en la LCST, mientras que los comonómeros hidrofílicos aumentan la temperatura (Lee & Yeh, 2005). Cuando los polímeros sintetizados a partir de NIPAAm se sintetizan con grupos pH-ionizables, como el ácido carboxílico, así los geles pueden generar respuestas de hinchamiento rápidas y dirigidas a múltiples estímulos externos, como temperatura y pH (Ballauff & Lu, 2007).

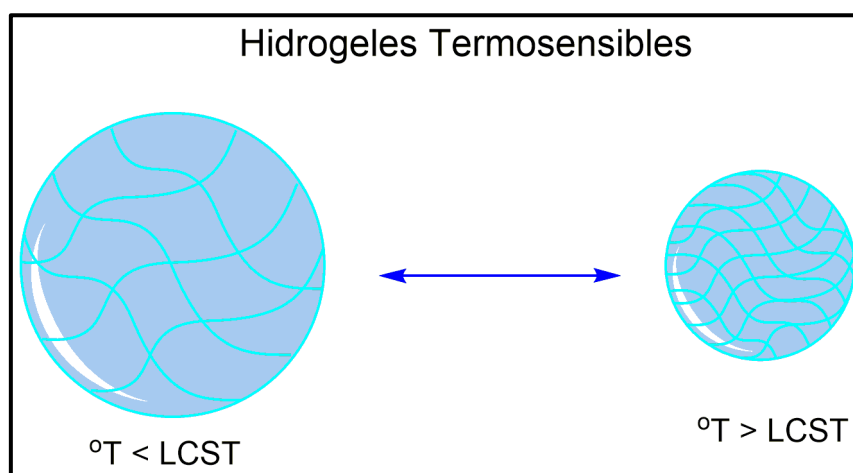


Figura 2. Representación de hinchamiento de nanogel

Los nanogeles termosensibles, son una clase de nanogeles que pueden responder a cambios de temperatura, en base a la temperatura de transición del polímero. Este tipo de geles pueden inyectarse sistemáticamente para dirigirse a un tumor y desencadenar la liberación de un fármaco, por respuesta a un cambio de temperatura. La temperatura puede alterar las propiedades de un nanogel, tales como las interacciones polímero-polímero y polímero-agua, que traen consigo un cambio en el hinchamiento del gel con respecto al cambio de pH y/o temperatura (Rejinold et al., 2014).

II.4.2 Nanogeles sensibles a pH

Para poder realizar un polímero sensible al pH, puede introducirse grupos funcionales como: aminas, ácidos fosfóricos y ácidos carboxílicos en el nanogel. Estos grupos pueden aceptar o donar protones y someterse a cambios en consecuencia de su dependencia al pH, como lo es el hinchamiento del polímero o su solubilidad, que lleva a la liberación del fármaco (Liu et al., 2014). Los polímeros sensibles al pH son una clase de polielectrolitos con grupos ionizables en su estructura, ya sea en grupos laterales o finales. Cuando el medio acuoso de una composición iónica cambia, los nanogeles son ionizados y drásticamente cambia su conformación. Generalmente los grupos funcionales que hacen a un nanogel sensible a pH pueden ser grupos ácidos o básicos que acepten o donen protones en respuesta al cambio de pH, estos polímeros pueden ser sometidos a cambios conformacionales debido a la variación de pH que puede ser: disociación, desestabilización por colapso o hinchamiento, y cambios en el coeficiente de partición entre el fármaco y el transportador (Liu et al., 2014).

Los polímeros utilizados para respuesta a pH suelen ser aniónicos, que generalmente contengan ácido carboxílico en su estructura. En medios ácidos,

los polímeros están protonados y su estructura es relativamente hidrofóbica, en caso contrario, al ser desprotonados en un pH por arriba de su pKa, se vuelven más hidrofílicos. Estos polímeros pueden empezar teniendo carga negativa y cambiar a carga positiva cuando el pH disminuye (Liu et al., 2014).

Los componentes sensibles al pH que llevan grupos ácidos débiles, como un polielectrolito aniónico, se pueden incorporar a PNIPAAm. Cuando un polielectrolito catiónico es mezclado con un polielectrolito aniónico, se forma un complejo de polielectrolito mediante atracción electroestática entre dos cargas opuestas de polielectrolitos. Por lo anteriormente mencionado, se espera que el LCST del PNIPAAm con componentes sensibles al pH se vean afectados por el complejo de polielectrolito, dependiendo los diferentes valores de pH (Kyong et al., 1998).

Es importante señalar que si el polímero es expuesto a un pH mayor que el de su pKa, y más alto que el pH del ácido contenido, el fenómeno de hinchamiento en transición del hidrogel puede desaparecer (Yoo et al., 2000).

II.5 CÁNCER

En la actualidad, nos encontramos en una etapa donde los fármacos van innovándose, pero a la vez van incrementando su potencial, generando así un incremento en el interés para desarrollar nuevos métodos de liberación de fármacos que nos ayuden a administrar el principio activo (Kost & Langer, 2012).

El cáncer es un gran problema biológico, debido a que representa una de las primeras dos causas de muerte en países económicamente desarrollados. Una de cada 8 muertes se debe al cáncer, y se calcula que para 2030 habrá 21.4 millones de casos nuevos y 13.2 millones de muertes por esta causa (Rajan et

al., 2016). Esta enfermedad es atribuida tanto a factores internos como externos, por ejemplo, dietas insuficientes, exposición a radiación, tabaco (Tacar et al., 2013).

El cáncer es una enfermedad degenerativa que se basa en la proliferación incontrolable de células tumorales (Ndong Ntoutoume et al., 2015). Una de las problemáticas actuales donde se pretende utilizar un sistema de liberación adecuado es en el tratamiento anticancerígeno. Actualmente, se cuenta con varios tratamientos: quimioterapia, cirugía, terapia hormonal, radiación, inmunoterapia, y terapia génica; a pesar de que hay varias opciones, la quimioterapia sigue siendo la número 1 en opción para el tratamiento anticancerígeno. La quimioterapia es el tratamiento donde se utilizan fármacos citotóxicos para eliminar las células cancerígenas (Norouzi et al., 2016), aunque existen diversos fármacos potentes usados en los diversos tipos de cáncer, éstos no presentan un cambio significativo en el progreso del tratamiento debido a la ausencia de selectividad celular y limitaciones como la baja solubilidad en agua, baja disponibilidad y baja eficiencia, trayendo consigo efectos adversos tóxicos, debido a la liberación sistémica (Ge et al., 2016; Ndong Ntoutoume et al., 2015; Norouzi et al., 2016). Debido a lo previamente mencionado, se sugieren diferentes métodos de liberación para un tratamiento focalizado; dentro de estas se sugieren las micelas, los liposomas, hidrogeles, nano/micropartículas, entre otros (Norouzi et al., 2016), con el fin de transportar un fármaco hidrofóbico al tejido dañado (Abandansari et. al., 2014). En algunas ocasiones, las micelas poliméricas suelen ser disociadas en unidades, los cuales pueden ser eliminados en circulación sanguínea, lo que causa una liberación sistémica y, por lo tanto, toxicidad. La búsqueda de la estabilidad en la micela polimérica es un problema

que trae consigo muchos estudios, las micelas entrecruzadas es una de las herramientas más potentes para estabilizar la estructura auto-ensamblada. La ventaja de los diversos estudios es que se podría lograr una liberación focalizada de los medicamentos (Cao et al., 2016).

II.5.1 Tumores

Un tumor es definido como un neoplasma, formado de grupos de células heterogéneas que se proliferan agresivamente y no se desarrollan adecuadamente. El tejido tumoral es abarcado por dos componentes: la proliferación celular y de estroma, el cual comprende a los vasos sanguíneos y tejido conectivo (Tacar et al., 2013). La metástasis es el responsable para que el 90% de los casos de cáncer sean mortales. Para que se genere una metástasis, enzimas como la metaloproteinasa de matriz debe romper el tejido de la célula hospedera (donde se encuentra el tumor), una vez que los capilares están dañados o presentan fugas, parte de los racimos de tumores viajan a través de distintas regiones del cuerpo. El tumor puede inducir la angiogénesis, para así permitirse crecer con su propio suministro de sangre y recibir los nutrientes y oxigenación necesarios para su crecimiento y así poder crecer en distintos lugares (Tacar et al., 2013; Yao et al., 2017). Cabe señalar que los tejidos tumorales crean un microambiente más ácido que los demás tejidos, ya que un tumor sólido tiene un pH de 6.5 a 7.2, cuando el tejido fisiológico es de 7.4 (Gong et al., 2016; Prabhakarandian et al., 2015), además de que hay un ambiente de hipoxia, este fenómeno se atribuye a la irregularidad con el metabolismo de la glucosa. Alrededor del 85% de tumores sólidos tienen un 10% menos de vasos sanguíneos (Prabhakarandian et al., 2015).

II.5.2 Efecto potenciado de permeabilidad y retención

El efecto potenciado de permeabilidad y retención (EPR) es un fenómeno que se encuentra únicamente en tejidos tumorales, cambiando así su anatomía y fisiología, comparado con un tejido normal. Dentro de este tejido, se presentan fenestras de 100 a 600 nm entre las células endoteliales, por lo cual facilita un extravasado de moléculas de diversos tamaños (Jhaveri et al., 2014). Debido a la rapidez con que se forman los tejidos tumorales, se realiza una angiogénesis apresurada, lo cual trae consigo una alta densidad vascular en los tumores, muestran extravasación selectiva y retención de fármacos macromoleculares (Fang et al., 2011). La angiogénesis es indispensable para el crecimiento del tumor y su progresión; cuando la vasculatura original no pueden brindar una adecuada alimentación y oxigenación a los tejidos tumorales, los vasos sanguíneos pueden ser activados y estirarse hacia las áreas sin vasculatura, guiadas por macromoléculas del factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA, por sus siglas en inglés) (Yao et al., 2017). Este fenómeno es una de las estrategias primordiales para la utilización de nanocarreadores para liberación de fármacos que se basa sólidamente en las características fisiopatológicas para una liberación focalizada y pasiva. El tamaño de los nanocarreadores es crucial para la utilización de este efecto, ya que unos nanogeles muy pequeños promueven la fuga por capilares, mientras que unos nanogeles de un gran tamaño, se vuelven mayormente atractivos para la depuración por el sistema retículo-endotelial (Jhaveri et al., 2014).

II.6 SISTEMA DE LIBERACIÓN PARA ANTICANCERÍGENOS

Existen diversos métodos para crear un sistema de liberación controlada de medicamento por medio polimérico, que ha evolucionado con la intención de

prolongar y mejorar el control de la liberación de un fármaco (Kost & Langer, 2012).

La idea de desarrollar “nanovehículos” que sean capaces de transportar el medicamento hidrófobo hacia el sitio de acción, liberar el fármaco sólo en esa área y así, reducir los efectos secundarios, trae consigo una gran relevancia debido a que este tipo de sistemas podría generar un acumulación de fármaco y retener su efecto, pudiendo liberar el fármaco en el endosoma y lisosoma por hidrólisis de pH, aunque también podría ser atrapado por la célula en vía endocítica (Abandansari et al., 2014; Asadi & Khoee, 2016; Cuggino et al., 2016; Mauri et al., 2016; Zhou et al., 2013).

Los nanogeles, ante los lisosomas y micelas, tienen grandes ventajas debido a que al tener una mayor porosidad se permite una carga abundante de fármaco, además de que su estructura entrecruzada permite una mayor estabilidad en suero fisiológico; por lo tanto, es una alternativa ideal para la administración de fármacos anticancerígenos (Zhu et al., 2017).

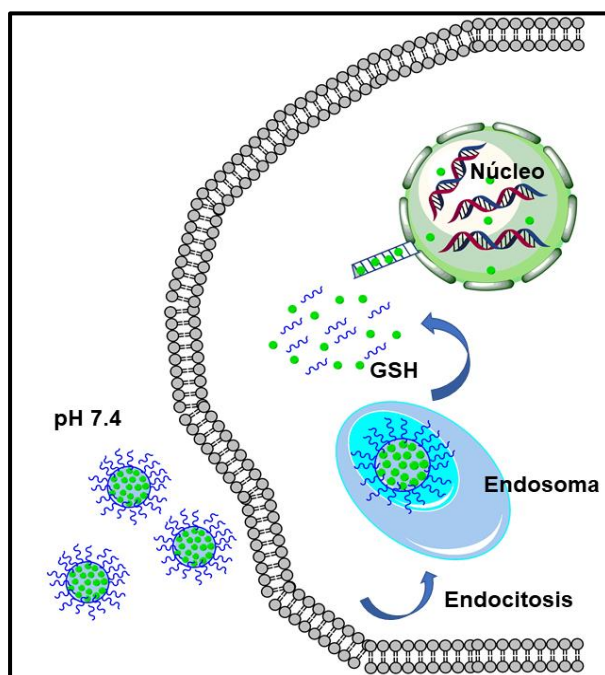


Figura 3. Representación de sistema de liberación intracelular para anticancerígenos.

II.6.1 5-FLUOROURACILO

El 5-Fluorouracilo (5-FU) es un medicamento que se encuentra en la primera línea de anticancerígenos utilizados en padecimientos de cáncer colorrectal, gastrointestinal, de mama, cerebro e hígado (L. Li et al., 2016). El 5-FU es un análogo de pirimidina que actúa transformándose en distintos metabolitos citotóxicos dentro de la célula que se incorporan al ADN y ARN, lo cual trae consigo la apoptosis celular (Egodawatte et al., 2017; Rejinold et al., 2014). Es importante recalcar que la eficacia del 5-FU se ve afectada por distintos factores: la inclinación a crear resistencia en las células tumorales, citotoxicidad, tiempo de vida media corto, de aproximadamente 20 minutos, adsorción irregular en vía oral, además de que gran cantidad es metabolizada por el cuerpo. Por lo tanto, su prescripción es en dosis altas, incrementando los efectos adversos como: diarrea severa, embolias y mucositis gastrointestinal (Egodawatte et al., 2017; L. Li et al., 2016). Comparando su baja efectividad al administrarse de manera libre, ya sea oral o intravenosa, el hecho de encapsularla en un nanogel trae consigo muchas ventajas, ya que se mejora la solubilidad en agua, provee propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, su tiempo en circulación aumenta, se reducen los efectos secundarios por su administración específica (W. Hu et al., 2016).

Por lo antes mencionado, hay una gran necesidad de desarrollar un Sistema de Liberación de Fármaco (DDS), para poder mejorar su eficacia terapéutica y poder reducir los efectos adversos. Los nanogeles han demostrado varias ventajas importantes sobre otros DDS debido a que tienen una buena estabilidad, se puede controlar el tamaño de la partícula, tienen gran variedad de grupos funcionales, y una fácil funcionalización (Arunraj et al., 2014).

Los nanotransportadores poliméricos anfifílicos generan una atracción como potenciales a ser transportadores de medicamentos por diversas ventajas: propiedades versátiles fisicoquímicas, mejoramiento en solubilidad del fármaco, prolongación del tiempo en circulación evitando que se depure rápidamente por el sistema renal y el sistema retículo-endotelial, disminuyendo efectos adversos, la orientación pasiva de los tumores a través del efecto EPR, y la mejora de la biodisponibilidad del fármaco. La carga del fármaco debería de ser liberada específicamente en los sitios de acción, maximizando el efecto terapéutico. Los polímeros entrecruzados deben actuar como barrera para la liberación del fármaco de manera intracelular (Li et al., 2013).

CAPÍTULO III

EXPERIMENTAL

III.1 GENERALIDADES

EQUIPOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

a) EQUIPOS

- Balanza analítica Denver Instrument M-220
- Potenciómetro Hanna Instruments HI 2210
- Espectrofotómetro UV-Vis Beckman coulter DU 520
- Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-H)
- Espectrofotómetro de Infrarrojo
- Dispersión de Luz Dinámica (DLS) Zetasizer nano series Malvern Instruments
- Recirculador Lauda Brinkmann Ecoline RE-106
- Baños de temperatura VWR
- Liofilizador Labconco freeze dry system/ Freezone 4.5
- Máquina de hielo Igloo

b) REACTIVOS

- N-isopropilacrilamida (Sigma-Aldrich Inc.)
- Ácido 6-aminocaproico (Sigma-Aldrich Inc.)
- Ácido 8-aminooctanoico (Sigma-Aldrich Inc.)
- Ácido 11-undecanoico (Sigma-Aldrich Inc.)
- Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich Inc.)
- Tetrahidrofurano (Spectrum)
- Cloruro de metacrililoilo (Sigma-Aldrich Inc.)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker)
- Éter etílico (Fermont)

- Sulfato de magnesio anhidro (Spectrum)
- Hidróxido de potasio (Spectrum)
- Metanol (Fermont)
- Éter de petróleo (Fermont)
- Acetato de etilo (Mallinckrodt)
- Hexano
- Diclorometano (Fermont)
- Dimetilacrilato de etilenglicol
- Persulfato de amonio (Sigma-Aldrich Inc.)
- Dimetilacetamida (Sigma-Aldrich Inc.)
- Nitrógeno (gas)

III.2 PURIFICACIÓN DE NIPAAAM POR RECRISTALIZACIÓN

En un matraz Erlenmeyer, se colocan 25 gramos de NIPAAm con 200 ml de hexano que se coloca en un baño maría a 45° C, se agita hasta que se disuelva por completo. Ya disuelto, se filtra en caliente para la eliminación de impurezas y se deja enfriar, manteniéndose tapado. Una vez cristalizado, se filtra al vacío y se dan dos lavados con hexano frío. Finalmente se deja secando en la campana.

Nota: los cristales deben mostrar una coloración blanca, si estos se observan amarillentos se deberá proceder a los lavados con hexano frío, o empezar nuevamente el procedimiento.

III.3 SÍNTESIS MONÓMEROS CARBOXIALQUILMETACRILAMIDAS

La síntesis del monómero se llevó a cabo por el método de Schotten-Baumann, referido a la formación de amidas por acrilación de aminas primarias.

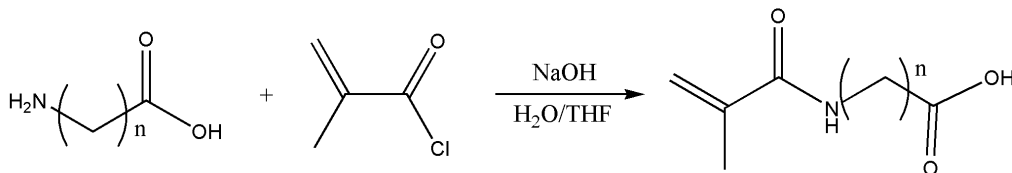


Figura 4. Síntesis para la obtención de carboxialquilmecrilmamidas.

La reacción se llevó a cabo a partir del cloruro de metacrililo y tres ω -aminoácidos, con diferentes números de metilenos en su cadena lateral.

- NMAHe, sintetizado a partir del ácido 6-aminocaproico ($n=5$)
- NMAOc, sintetizado a partir del ácido 8-aminooctanoico ($n=7$)
- NMAUn, sintetizado a partir del ácido 11-undecanoico ($n=10$)

La síntesis de los monómeros se llevó a cabo de la misma manera para los tres diferentes aminoácidos, descritos a continuación:

En un matraz bola de 250 ml se disuelven 5 gramos de ácido 11-undecanoico (24.8 mmol), en una disolución acuosa de NaOH (1N) /THF 20% v/v. La mezcla se colocó en un baño frío a 0° C y se mantuvo en agitación constante. Enseguida, se adicionó lentamente, con ayuda de una bomba de adición, 3.9 gramos de cloruro de metacrililo (37.3 mmol), con un tiempo de adición de 3 horas; después de terminada la adición, se continua en agitación constante por 24 horas, a temperatura ambiente. Al terminar la agitación, la mezcla se filtra al vacío para eliminar cualquier residuo o impureza, y se acidifica con HCl (2N) hasta llegar a un pH de 3, conservando la mezcla a 0° C y en agitación constante. El contenido se extrae con éter etílico, la fase orgánica obtenida se lava con HCl diluido y agua destilada. Posteriormente, se seca con MgSO_4 anhidrido, y se filtra

al vacío. Se continua con tres lavados con hexano de 30 min, y finalmente se vuelve a filtrar a vacío para dejar precipitar el monómero y proceder con la cromatografía de capa fina.

III.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS CARBOXIALQUILMETACRILAMIDAS

Para la caracterización de los monómeros se partieron a diferentes métodos que aseguraran la obtención de este tipo de monómero, además de asegurar que estuvieran puros para su uso en la síntesis de nanogeles, los cuales fueron: cromatografía de capa fina, espectrofotometría de infrarrojo y resonancia magnética nuclear a protón.

III.4.1 Cromatografía de capa fina

Para realizar las cromatografías, previamente se preparan soluciones del monómero que será analizado, disolviendo 50 mg del compuesto en 0.4 ml de metanol; se preparan las fases móviles utilizando: acetato de etilo y hexano. En una lámina de capa fina se coloca, con ayuda de un tubo capilar, una pequeña muestra de la solución del monómero previamente realizada, y se deja secar para después colocarla cuidadosamente a la cámara de cromatografía, donde se deja correr la fase móvil, para finalmente observarla con luz ultravioleta y sacar su factor de retención.

III.4.2 Espectrofotometría de infrarrojo

El infrarrojo fue realizado con el equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), por método directo a temperatura ambiente, usando el software OMNIC 09/02/41.

III.4.3 Resonancia magnética nuclear a protón.

La resonancia magnética nuclear de protón fue realizada por el equipo Varian Mercury NMR de 200 MHz. Se toman entre 10 y 15 mg de muestra, y se disuelve en cloroformo deuterado, dentro del tubo de RMN.

III.5 SÍNTESIS DE SAL POTÁSICA DE MONÓMEROS CARBOXIALQUILMETACRILAMIDAS.

La sal potásica de los diferentes monómeros fue sintetizada a partir de una igualación de moles con cada uno de los monómeros sintetizados.

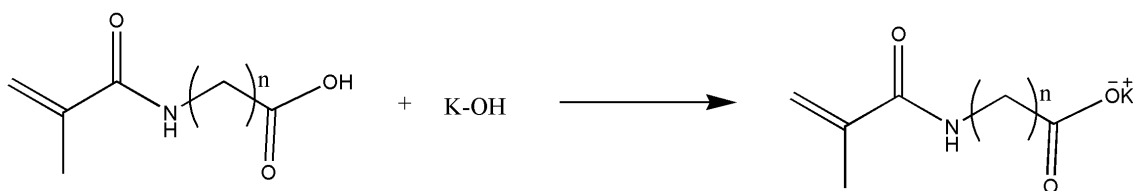


Figura 5. Síntesis para la obtención de sal potásica de carboxialquilmecrilamidas

Para realizar la síntesis se pesa una cantidad del monómero (entre 1 y 2 gramos), y después se pesa la cantidad calculada de KOH con ayuda de la siguiente fórmula:

$$gKOH = \frac{(PM\ KOH) * (g\ monómero)}{PM\ monómero}$$

Ecuación 1. Fórmula para obtención de gramos necesarios de hidróxido de potasio.

Se coloca el monómero y el hidróxido de potasio en dos diferentes vasos, y se les adiciona 3 mililitros de metanol a cada uno, y se colocan en un baño de hielo en agitación constante, hasta que se disuelvan completamente. Después de que se disuelvan por completo, se adiciona el hidróxido de potasio gota a gota al vaso del monómero disuelto. Después de adicionarlo, se precipita con éter etílico y se filtra por gravimetría, para después dejarla secar en la estufa a 35° C

por 24 horas. Finalmente se hacen pruebas de disolución para poder asegurar que es soluble en agua.

El procedimiento previamente descrito es para el monómero con 10 metilenos en su cadena latera, para el de 5 y 7 metilenos, además de agregar el éter etílico, se precipita también con ayuda del éter de petróleo y después se prosigue con los demás pasos.

III.6 SÍNTESIS DE NANOGELES DE NIPAAm: CAM

La síntesis de nanogeles se llevó a cabo por el método de polimerización por dispersión sin detergente. Todas las reacciones son 0.5 gramos en 50 mililitros de agua miliQ, previamente filtrada. Se realizaron geles con diferentes concentraciones de monómero y NIPAAm, que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Concentraciones utilizadas de NIPAAm y carboxialquilmetacrilamidas para síntesis de nanogeles.

Monómero	%	g	mmol	Comonómero	%	g	mmol
<i>NIPAAm</i>	95	0.475	4.198	M5	5	0.025	0.126
	90	0.450	3.977		10	0.050	0.251
	85	0.425	3.756		15	0.075	0.377
<i>NIPAAm</i>	95	0.475	4.198	M5K	5	0.025	0.105
	90	0.450	3.977		10	0.050	0.211
	85	0.425	3.756		15	0.075	0.316
<i>NIPAAm</i>	95	0.475	4.198	M7	5	0.025	0.011
	90	0.450	3.977		10	0.050	0.022
	85	0.425	3.756		15	0.075	0.033
<i>NIPAAm</i>	95	0.475	4.198	M7K	5	0.025	0.094
	90	0.450	3.977		10	0.050	0.189
	85	0.425	3.756		15	0.075	0.283
<i>NIPAAm</i>	95	0.475	4.198	M10	5	0.025	0.093
	90	0.450	3.977		10	0.050	0.186
	85	0.425	3.756		15	0.075	0.279
<i>NIPAAm</i>	95	0.475	4.198	M10K	5	0.025	0.081
	90	0.450	3.977		10	0.050	0.163
	85	0.425	3.756		15	0.075	0.244

El procedimiento que se siguió para realizar los nanogeles se concentró en administrar las concentraciones previamente señaladas en un matraz bola de 100 ml, donde se agregó 50 ml de agua miliQ, y el entrecruzante (EGDMA) al 5% en peso, para después quitarle el oxígeno con un burbujeo constante con nitrógeno por media hora en agitación constante. Después se colocó en un baño de aceite a 85° C, con agitación constante por media hora, para continuar con la adición del iniciador (APS) al 2% en peso, y se deja reaccionar por 45 min, en agitación constante a 85° C. Para detener la reacción, al pasar los 45 min se coloca la solución en un matraz Erlenmeyer en un baño de hielo, y después de que se enfría se coloca en una bolsa de diálisis de 14 kDa, para iniciar la purificación de 5 días. Al concluir los 5 días, se guardan en viales para congelarse y después proceder con el liofilizado.

III.7 LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES

Los nanogeles se sometieron a liofilización después del congelamiento previo mencionado en el punto anterior, y se colocaron en el liofilizador por 48 horas, finalizando el secado, se pudo observar un material blanco esponjoso, sin rastros de humedad.

Para la reconstitución del liofilizado, se tomaron 50 mg de nanogeles en 5 mililitros de agua miliQ, y se dejó en agitación constante por 4 horas, para así continuar con la caracterización.

III.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA NANOGELES DE NIPAAm/CAM

III.8.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Se utilizó el equipo de dispersión de luz dinámica DLS Zetasizer Nano NS equipado con luz verde a 532 nm con un ángulo de medición de 173°, para poder así medir el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en las soluciones obtenidas. La muestra se diluyó utilizando 20 µl de la solución de nanogeles con 980 µl de agua miliQ.

El efecto en la temperatura de transición, se hizo un barrido de temperaturas, que iniciaba en 20° C hasta los 50° C, haciendo mediciones cada 2°, para así observar la variación de diámetro respecto al aumento de temperatura, y determinar su temperatura de transición. Además de hacerse en agua miliQ, se realizaron en 4 diferentes pH: 3, 5, 7 y 9.

III.8.2 Espectrofotometría de infrarrojo

El infrarrojo fue realizado con el equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), por método directo a temperatura ambiente, usando el software OMNIC 09/02/41.

Se utilizaron muestras de nanogeles liofilizados, tanto los copolimerizados con monómero y sal, así como de NIPAAm al 100%.

III.8.3 Determinación del porcentaje de ácido

El contenido de CAM se determinó a través de una valoración potenciométrica ácido-base, en donde se pesaron 50 mg del liofilizado del nanogel, y se diluyeron en 5 ml de agua miliQ, que se dejaron reconstituyendo

por 4 horas. Se añade NaOH valorado al 0.05 M, hasta llegar a un pH de 11, para asegurar la ionización completa de los grupos de ácidos carboxílicos. Posteriormente, las reconstituciones se titulan lentamente agregándose HCl valorado al 0.05 M, con ayuda de una micropipeta, agregándose 25 μ l cada 8 segundos, hasta llegar a un pH de 3.

El contenido de CAM se calcula por el volumen de HCl 0.05 M consumido, entre los puntos de inflexión de la curva de titulación.

III.8.4 Potencial Z

Se utilizó el equipo de dispersión de luz dinámica (DLS), para analizar el potencial Z, éste se determina con la finalidad de conocer la carga de la superficie de las partículas.

Para la determinación del potencial Z, se prepararon disoluciones utilizando 50 μ l de muestra en 5 ml de buffer, los pH de éstos variaron de 3 a 9.

III.8.5 Microscopía electrónica de barrido FESEM

La microscopía electrónica de barrido fue realizada en el Centro de graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana, en un microscopio JEOL JSM-7800F Prime a 25 kV.

La preparación de la muestra se realizó a partir de la muestra dializada, colocándose en unas rejillas de carbono con cobre, con un Mesh de 400. Se colocaron 2 μ l de la muestra en la parte opaca de la rejilla, se secó con ayuda de un "kimwipe", se colocaron 2 μ l de acetato de uranilo, se procedió a secar, y finalmente se repitió la adición y secado del acetato de uranilo.

Después de la preparación, la rejilla fue colocada cuidadosamente a un tubo eppendorf, y se colocó la muestra en la estufa a 25° C durante 24 h para su secado.

III.9 CARGADO DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO (5-FU)

Para el cargado de fármaco se procedió con la técnica de cargado por medio de diálisis, llevándose a cabo con los siguientes pasos:

Inicialmente, se pesaron 20 mg de 5-FU y se agregaron a un vial con 7.5 ml de dimetilacetamida (DMAc) para disolver, por otro lado, se pesaron 40 mg de microgeles y se resuspendieron con 7.5 ml de DMAc, la disolución fue realizada con agitación magnética 2 horas, a temperatura ambiente.

La solución de 5-FU se administró a la solución de nanogeles “gota a gota”, en agitación a 20° C. La solución resultante se dejó en agitación por 12 horas, para después verterse a una bolsa de diálisis (con un corte de peso molecular de 12 a 14 kDa), y se somete a diálisis con agua destilada por 4 horas, con la finalidad de remover el fármaco no encapsulado. El agua destilada se reemplaza cada 30 min las primeras 2 horas, y finalmente cada hora.

Finalmente, la solución extraída de la diálisis se liofiliza para remover el agua, y la carga del fármaco se determina midiendo la absorbancia UV a 267 nm en el espectrofotómetro UV-Vis, calculándose el porcentaje de carga y la eficiencia de cargado con las siguientes fórmulas:

III.10 LIBERACIÓN DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO (5-FU)

Para la liberación del fármaco de los nanogeles, se prepararon las membranas de diálisis (corte de 15 kDa) de la siguiente manera:

Se colocan 5 ml de buffer 7.4 y se añaden 5 mg de nanogeles cargados y finalmente se colocan otros 5 ml de buffer. La diálisis fue colocada contra 50 ml del mismo buffer en un vaso del recirculador, con una temperatura de $37^{\circ} 25^{\circ} \text{C}$, y dejándose en agitación constante. 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). Las muestras se leyeron en UV-Vis a 267 nm, y se calculó el % de liberación con la curva de calibración para liberación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1 SÍNTESIS DE MONÓMEROS CARBOXIALQUILMETACRILAMIDAS.

Se obtuvieron los 3 monómeros por medio de la reacción Schotten-Baumann. En el caso del monómero 6-metacriloilamidocaproico (M5), se obtuvo un semisólido color naranja, viscoso, similar a la consistencia de la miel de abeja, con un rendimiento en la reacción de 41.51%.

En el caso del monómero 8-metacriloilamidooctanoico (M7), se obtuvo un semisólido de color beige, con una consistencia cerosa, con un rendimiento en la reacción de 65.15%.

Y finalmente, en el caso del monómero 11-metacriloilamidoundecanoico (M10), se obtuvo un sólido de color blanquecino, no muy dura, similar a la consistencia de un jabón, con un rendimiento en la reacción de 50.27%.

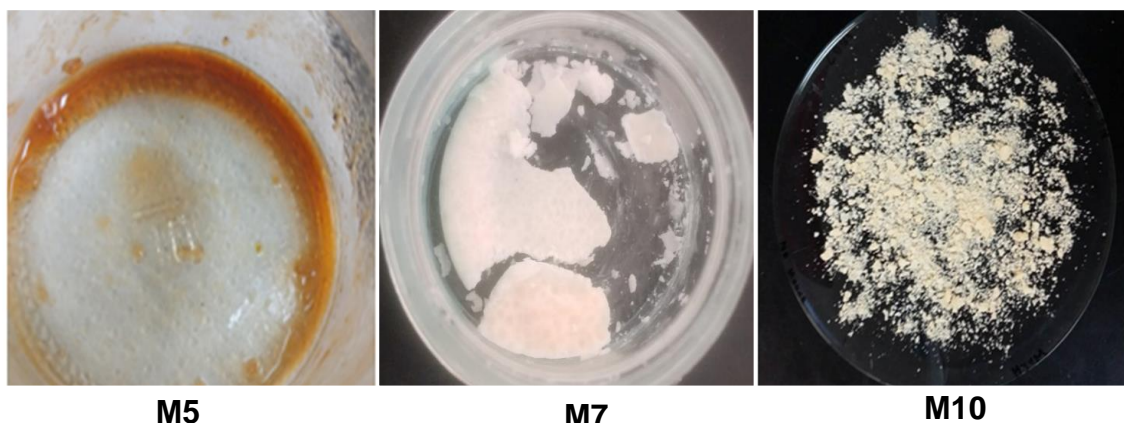


Figura 6. Monómeros obtenidos a partir de la síntesis de carboxialquilmetacrilamidas

IV.2 CARACTERIZACIÓN DE MONÓMEROS CARBOXIALQUILMETACRILAMIDAS.

Para la caracterización de los monómeros, se recurrieron a 3 pruebas, con la intención de asegurar la obtención de los compuestos esperados.

IV.2.1 Cromatografía de capa fina

La cromatografía fue realizada por el método de capa fina, donde se utilizaron como fase móvil n-hexano como parte no polar, y acetato de etilo como parte polar, en proporciones 4/6 para el caso del monómero M7 y M10. En el caso del M5, se cambiaron las fases debido a la polaridad del monómero y finalmente se utilizaron metanol y diclorometano en proporciones 1/9 respectivamente.

Finalmente se pudo comprobar que los compuestos eran puros, debido a que no hubo algún otro compuesto dentro de la corrida de la cromatografía.

IV.2.2 Espectrofotometría de Infrarrojo

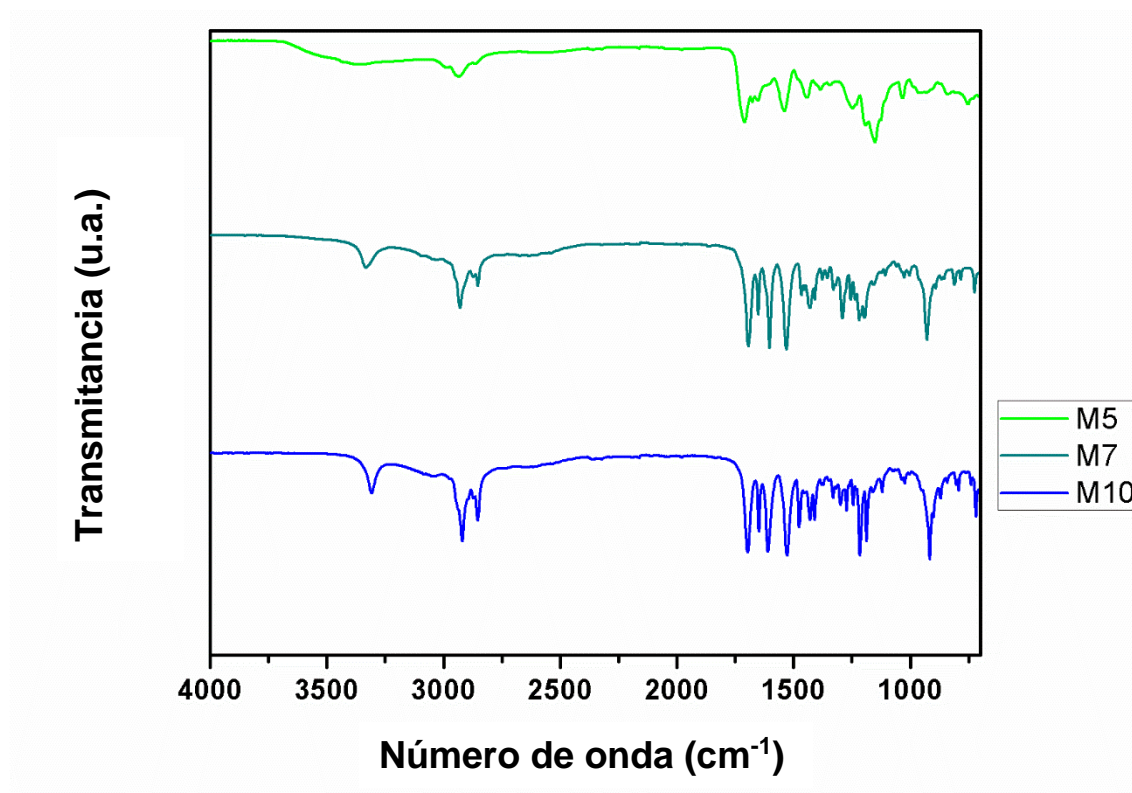


Figura 7. Espectro de infrarrojo de monómeros M5, M7 y M10

El infrarrojo fue una herramienta importante para la caracterización de los monómeros debido que se pudieron observar las bandas características de los grupos funcionales que se encuentran presentes en los ya mencionados.

Los grupos funcionales que se encontraron en el monómero M5 fueron los siguientes: la banda característica del enlace (N-H) de la amida se encuentra a 3367 cm^{-1} ; a 2937 cm^{-1} se observa la banda que representa al enlace (C-H), que se encuentra en la parte vinílica y alifática del monómero; a 1709 cm^{-1} se observa la banda característica del grupo carboxilo (C=O), presente en la amida y el grupo carboxílico; seguido de esta banda a una longitud de onda de 1651 cm^{-1} se observa la banda característica de la parte vinílica (C=C); y en las longitudes de onda 1444 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} , se pueden observar las bandas representativas de la parte alifática, que corresponden a (CH₃) y (CH₂), respectivamente. Finalmente, a la longitud de onda de 1032 cm^{-1} se encuentra la banda característica del enlace (C-O), enlace que representa la presencia del grupo del ácido carboxílico. En la siguiente tabla se pueden apreciar las bandas características de los 3 monómeros:

Tabla 2. Señales características de grupos funcionales encontrados en M5, M7 y M10

Monómeros				cm ⁻¹	Longitud de onda
Enlaces	M5	M7	M10		
N-H	3367	3333	3311		
C-H	2937	2929	2919		
C=O	1709	1693	1697		
C=C	1651	1651	1648		
CH₃	1444	1530	1429		
CH₂	1380	1334	1409		
C-O	1032	927	916		

IV.2.3 Resonancia magnética nuclear de protón

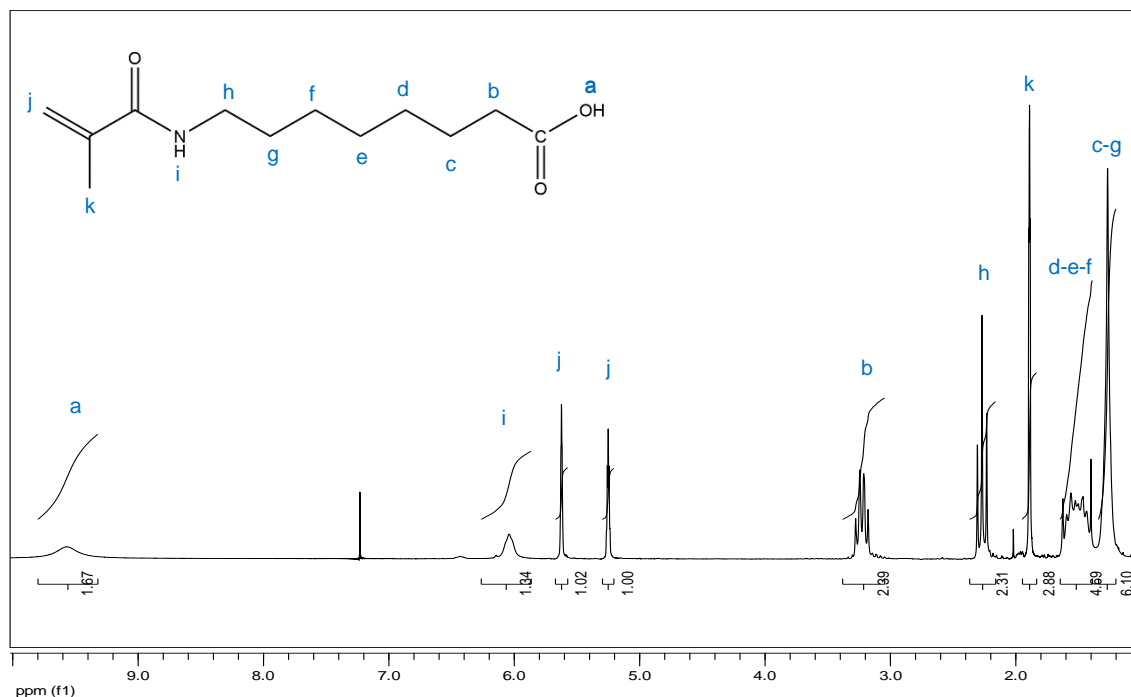


Figura 8. Espectro de Resonancia magnética nuclear de protón en M7

El estudio que concluyó con la caracterización del monómero, fue someterla a resonancia magnética nuclear para protón, donde los resultados mostraron lo siguiente:

La señal que se encuentra alrededor de 9.6 ppm en forma de singulete alargado que integra para uno, se le atribuye al hidrógeno presente en el ácido carboxílico, debido a que sus desplazamientos son de 10 a 13 ppm, sin embargo, por estar pegada a una cadena alifática pudo haberse recorrido un poco la señal. La siguiente señal en el espectro está en 6.0 ppm, otro singulete ancho que integra para uno, se atribuye al hidrógeno de las amidas, señales que aparecen alrededor de 5 a 9 ppm. Hay dos señales casi juntas, una en 5.2 y otra en 5.6 ppm, las dos señales aparecen como singuletes e integran para uno e indican la misma letra de protón, sin embargo, los dos hidrógenos de la parte vinílica son diferentes debido a que uno de ellos está del lado de la amida, y debido a la

electronegatividad de este grupo funcional, se desprotege más ese protón que el que está vecinal con el metilo.

Alrededor del 3.2 ppm se encuentra un doble de dobles, que indica la presencia de dos vecinos cercanos a ese protón, además de que integra para 2 protones. Por su desplazamiento, integración y tipo de señal, se atribuye al protón del carbono seguido del ácido carboxílico, debido a que por la electronegatividad que genera el grupo, hay un cierto tipo de desprotección, comparada con la demás parte de la zona alifática. Alrededor de 2.2 ppm se encuentra un multiplete que integra para dos, señal atribuida al protón del carbono pegado a la amida, desprotege levemente al protón. Finalmente se encuentran las señales que se asignan a la cadena alifática. Se puede observar un singulete alrededor de 1.8 ppm, que integra para 3, esta señal, debido a su protección e integración se atribuye al metilo que está pegado al grupo amida. Seguida de esta señal se encuentra un multiplete en 1.4 ppm que integra para 4, señal que se atribuye a los protones de la cadena alifática que están a 3 enlaces de los dos grupos funcionales, y al final se encuentra una señal, que es otro multiplete en 1.2 ppm que integra para 6, esta señal se asigna para los protones que están a 4, 6 y 8 enlaces del grupo funcional.

Los monómeros M5 y M10 también fueron sometidos a resonancia magnética nuclear, los cuales se pueden encontrar en ANEXO 1.

IV.3 SÍNTESIS DE SAL POTÁSICA DE MONÓMEROS CARBOXIALQUILMETACRILAMIDAS

Se preparó la sal potásica de cada uno de los monómeros, para obtener la materia prima para la síntesis de nanogeles.

La sal que se obtuvo a raíz del monómero M5, fue de color naranja claro, semisólido, pastoso y muy higroscópica; se obtuvo un porcentaje de rendimiento de la reacción de 68.14%. La sal obtenida a partir del monómero M7, fue de color blanquecina, semisólido, ceroso; se obtuvo un porcentaje de la reacción de 81.29%. Finalmente, la sal obtenida a partir del monómero M10, fue de color blanquecina, sólido duro y se obtuvo un porcentaje de rendimiento 51.12%.

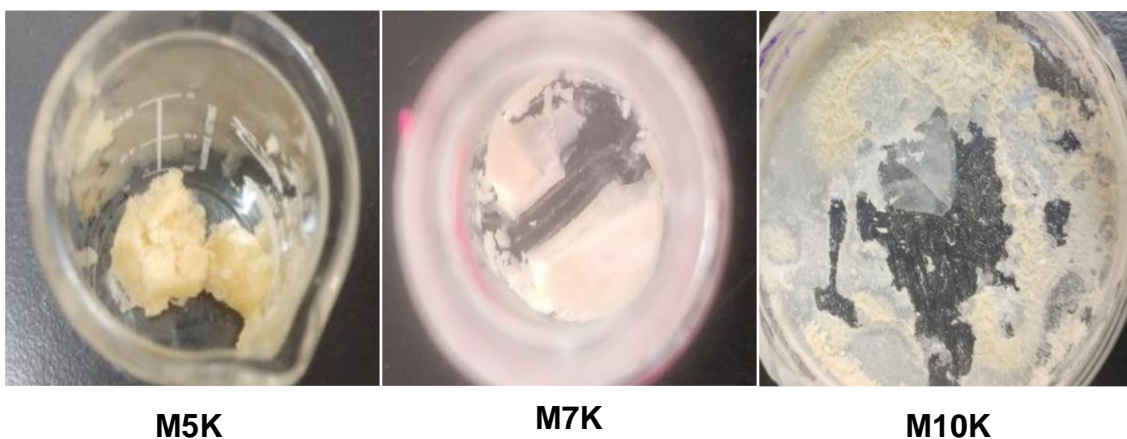


Figura 9. Sales potásicas obtenidas a partir de monómeros M5, M7 y M10

IV.4 SÍNTESIS DE NANOGELES DE NIPAAm/CAM

En la síntesis de nanogeles, se obtuvieron 18 reacciones, obtenidas bajo el siguiente criterio: se realizaron diferentes concentraciones (porcentaje en peso) del comonómero (5, 10 y 15%), además de que, en su respectiva sal, también se llevaron a cabo las mismas concentraciones de comonómero. En todos los casos se utilizó el mismo entrecruzante (EGDMA) e iniciador (APS) en los mismos porcentajes en peso, 5 y 2% respectivamente.

IV.5 CARACTERIZACIÓN DE NANOGELES NIPAAm/CAM

La caracterización de los nanogeles se realizó pasando por varias pruebas, inicialmente se leyeron los crudos en el DLS, después se sometió a diálisis de 5 días, conllevando a una segunda leída, y posteriormente se

congelaron para liofilizarse y de ahí seguir haciendo mediciones para analizar su comportamiento en diferentes pH's y temperatura.

IV.5.1 Diámetro hidrodinámico de nanogeles purificados en diálisis

El tamaño de los nanogeles se determinó por medio del DLS, para poder determinar su diámetro hidrodinámico, las siguientes mediciones fueron realizadas a partir de las dispersiones dializadas, mostrando los siguientes resultados:

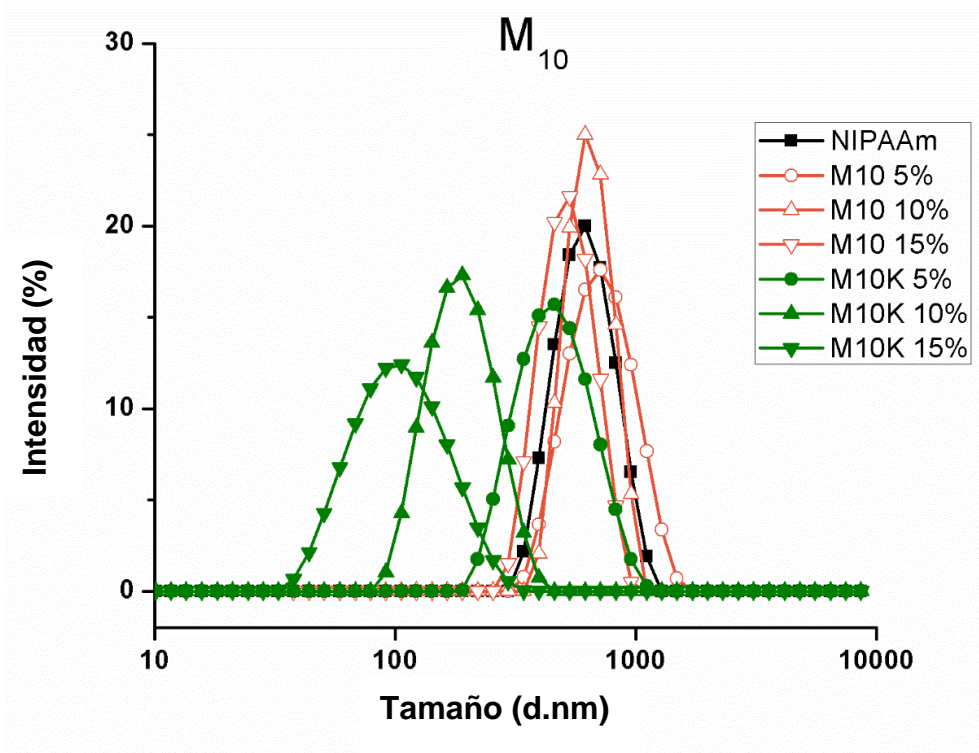


Figura 10. Diámetro hidrodinámico de nanogeles de NIPAAm:M10 purificadas.

Como se puede observar en la gráfica anterior, hay una variación mínima en el cambio del diámetro cuando va aumentando la cantidad de ácido del M10, sin embargo, se observa que, en el caso del incremento en la proporción de sal, hay un cambio significativo en el diámetro, demostrando el efecto tensoactivo que genera la sal en los nanogeles. Se puede observar en la gráfica que, al

administrarse el monómero, en su forma ácida, la variación es mínima, ya que los tamaños están en un rango de 700-800 nm, por otro lado, se aprecia que el cambio en el diámetro en las diferentes proporciones de sales hay un gran cambio, haciendo una variación que inició en 421.7 nm, y un mínimo de 91.1 nm al administrarse el mayor porcentaje de M10K (15%). Es importante señalar que este efecto tensoactivo se ve potenciado en la administración de la sal, sin embargo, en los 3 monómeros ácidos no hay una variabilidad significativa en los tamaños (ANEXOS 2 y 3).

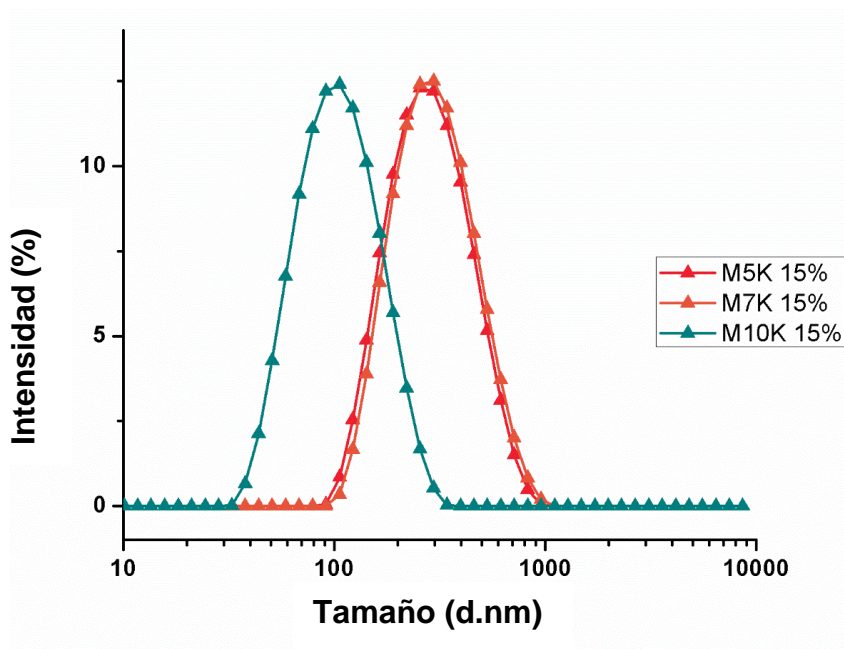


Figura 11. Diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:CAM en forma de sal al 15%

Se puede observar en la gráfica que, al ser los de menor tamaño y haber sufrido el efecto tensoactivo mayor, en el caso del M5 y M7, no hay un cambio entre ellas, y el efecto mayor se dio en el caso del M10, siendo la sal con la cadena más larga, monómero que al hacerse sal generó un gran cambio, comparándose con M10 al 15%.

IV.5.2 Diámetro hidrodinámico de nanogeles copolimerizados NIPAAm: CAM

Después de analizarse la diálisis, se vaciaron las soluciones de nanogeles en viales de 20 mililitros, para proceder al congelamiento y liofilizado de 36 horas. Los rendimientos obtenidos fueron altos en todos los casos, lo que demuestra la estabilidad de los nanogeles al congelarse, además que, al obtener bastante rendimiento, se facilitó la caracterización de éstos. Seguido a esto, se procedió a analizar si los nanogeles seguían estables, y se volvió a medir el diámetro hidrodinámico, resuspendiendo 5 miligramos de muestra en 5 mililitros de agua miliQ, dejándose en agitación constante por 4 horas, para finalmente leerlos en el DLS a 25° C, obteniéndose los resultados mostrados en el ANEXO 4.

Tabla 3. Porcentajes de rendimientos obtenidos en liofilizados de nanogeles.

Monómero		Sal monómero	
NIPAAm: M5		NIPAAm:M5K	
% M5	%R	%M5K	%R
5	80.41	5	65.00
10	59.82	10	68.78
15	72.38	15	63.74
NIPAAm: M7		NIPAAm:M7K	
% M7	%R	%M7K	%R
5	77.42	5	83.48
10	81.50	10	87.71
15	74.88	15	84.69
NIPAAm: M10		NIPAAm:M10K	
% M5	%R	%M5K	%R
5	80.41	5	65.00
10	59.82	10	68.78
15	72.32	15	63.74

Para leerse, las resuspensiones se diluyeron 1:50, tomándose una muestra de 20 µl en 980 µl de agua miliQ. Se pudo percibir que las partículas

seguían siendo estables, debido a que su polidispersión no variaba demasiado, además de que se pudieron leer después de resuspenderse. Cabe señalar que la variación en tamaño resulta igual que en la diálisis, demostrándose nuevamente el efecto tensoactivo en los nanogeles copolimerizados con las sales potásicas de los diferentes monómeros.

IV.5.3 Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles

Los nanogeles fueron expuestos a distintos pH's para poder realizar su afectación al diámetro, dependiendo el ambiente al que se veía expuesto. La prueba se realizó diluyendo 20 μl en 980 μl del buffer con el pH deseado (3, 5, 7 o 9), para posteriormente hacer la medición en el DLS (Figura).

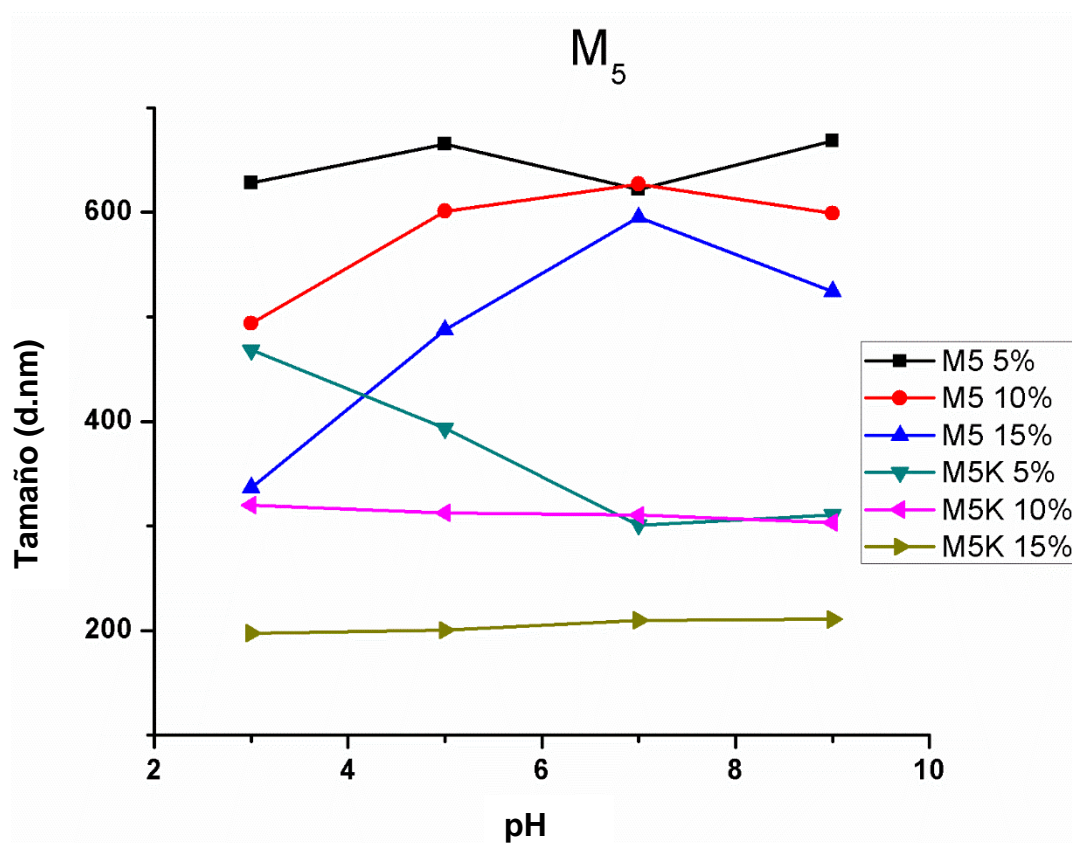


Figura 12. Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:M5.

Se puede observar en la imagen que los nanogeles copolimerizados con la parte ácida del monómero M5 muestran variación de tamaño, aumentando su tamaño conforme aumenta el porcentaje del monómero presente en la reacción, habiendo una posible ionización de los nanogeles, por lo cual se justifica el incremento de tamaño; en el caso de las sales, no hay alguna variación significativa en su tamaño, haciéndolas insensibles al cambio del pH, con esto se puede deducir que la sal queda en la superficie, por lo cual no hay alguna afectación en las propiedades de la NIPAAm, caso contrario que ocurre al utilizar la parte ácida, debido a que ahí se puede observar una interacción entre el monómero M5 con la NIPAAm, habiendo una copolimerización dentro del nanogel.

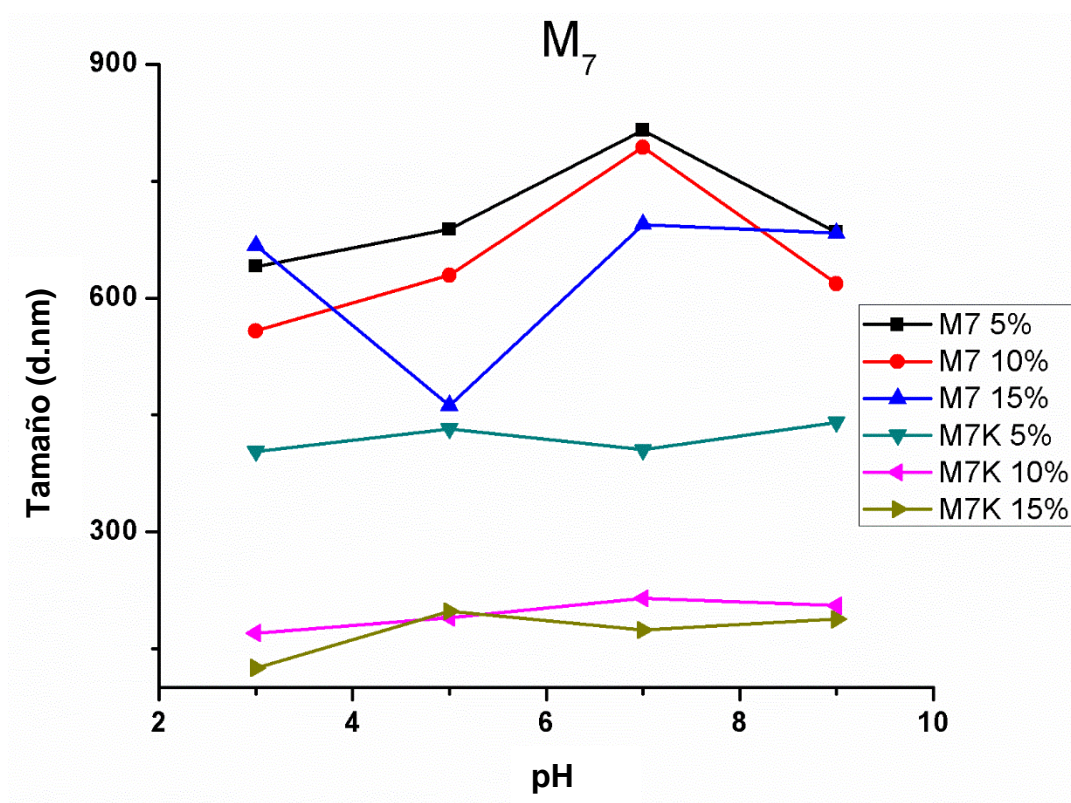


Figura 13. Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:M7.

Caso similar al previamente descrito, se observa en el caso de los nanogeles copolimerizados con M7, donde se puede observar el mismo fenómeno, cuando hay un incremento del porcentaje utilizado de la parte ácida del monómero se puede observar el incremento en los nanogeles, cuando se utiliza la sal del M7, los nanogeles no presentan un cambio cuando se va incrementando el pH lo cual indica, nuevamente, que al sintetizar nanogeles con la sal, ocurre una polimerización por bloque, quedando de manera superficial del nanogel, por lo tanto, no hay alguna afectación en las propiedades de la NIPAAm.

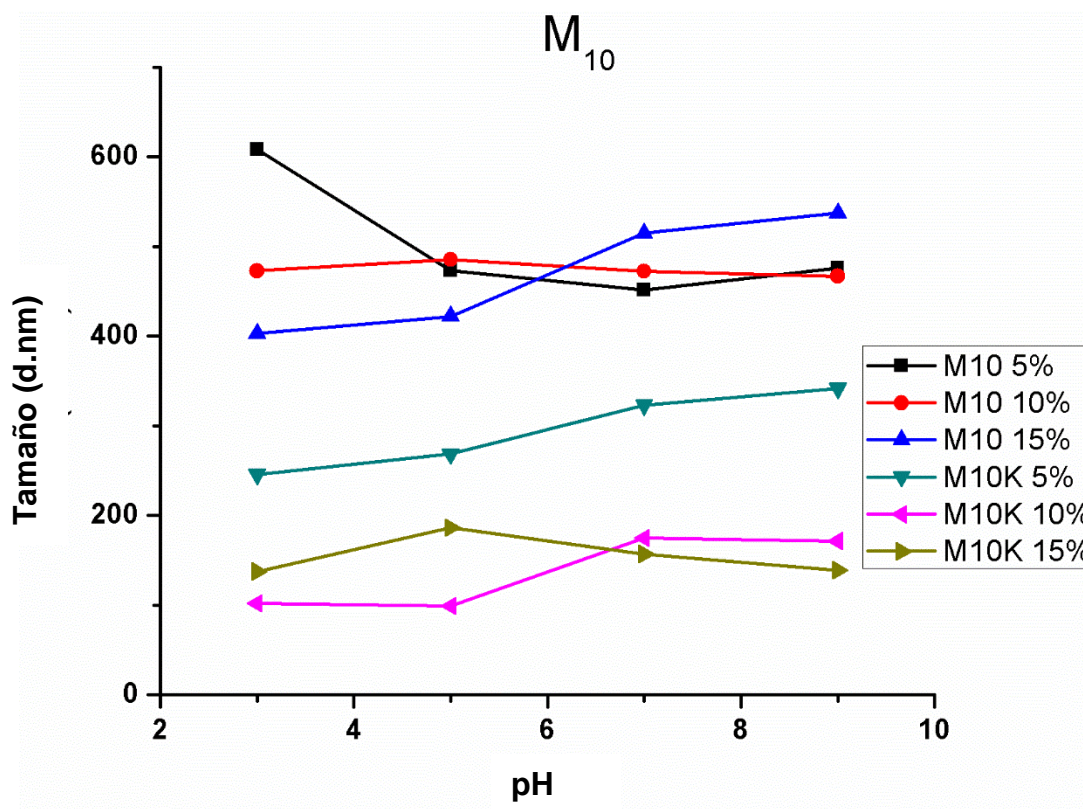


Figura 14. Efecto de pH en diámetro hidrodinámico de nanogeles NIPAAm:M10.

Finalmente, en el caso del M10, se puede observar que no se percibe tanto una afectación del tamaño conforme incrementa el pH, en su forma ácida

o en su forma de sal, los tamaños se mantienen, debido a que al ser demasiada larga la cadena alifática

IV.5.4 Efecto de la temperatura y pH en los nanogeles copolimerizados con NIPAAm: CAM

La prueba del efecto de temperatura se realizó mediante el DLS, haciendo escaneos de tamaño desde 20° a 50° C, cada dos grados centígrados, generando una tendencia para determinar la temperatura de transición; esta prueba se realizó en agua miliQ, además de en 4 diferentes pH's: 3, 5, 7 y 9. Se puede observar que, dependiendo el pKa, afecta su aglomeración en los distintos sistemas. Al analizar el comportamiento de los nanogeles en agua, junto a la NIPAAm, se puede observar que los nanogeles utilizados como blanco, con un 100% de NIPAAm se comportan como marca la literatura, debido a que su temperatura de transición se observa a los 32° C (Musial et al., 2017; Serrano-Medina et al., 2012). A su vez, se observa el cómo en los tres casos, al copolimerizar a la NIPAAm con la forma ácida del monómero, aumentan en tamaño y se percibe una afectación en su temperatura de transición, generalmente por arriba de los 32° C, lo que indica que el monómero interacciona con la NIPAAm y afecta su transición; se observa de igual manera que al tener los nanogeles copolimerizados con la sal del monómero, no hay una variación en su temperatura de transición, por lo que se deduce que la sal queda en la superficie y no hay interacción, por lo cual no hay afectación en las propiedades de la NIPAAm.

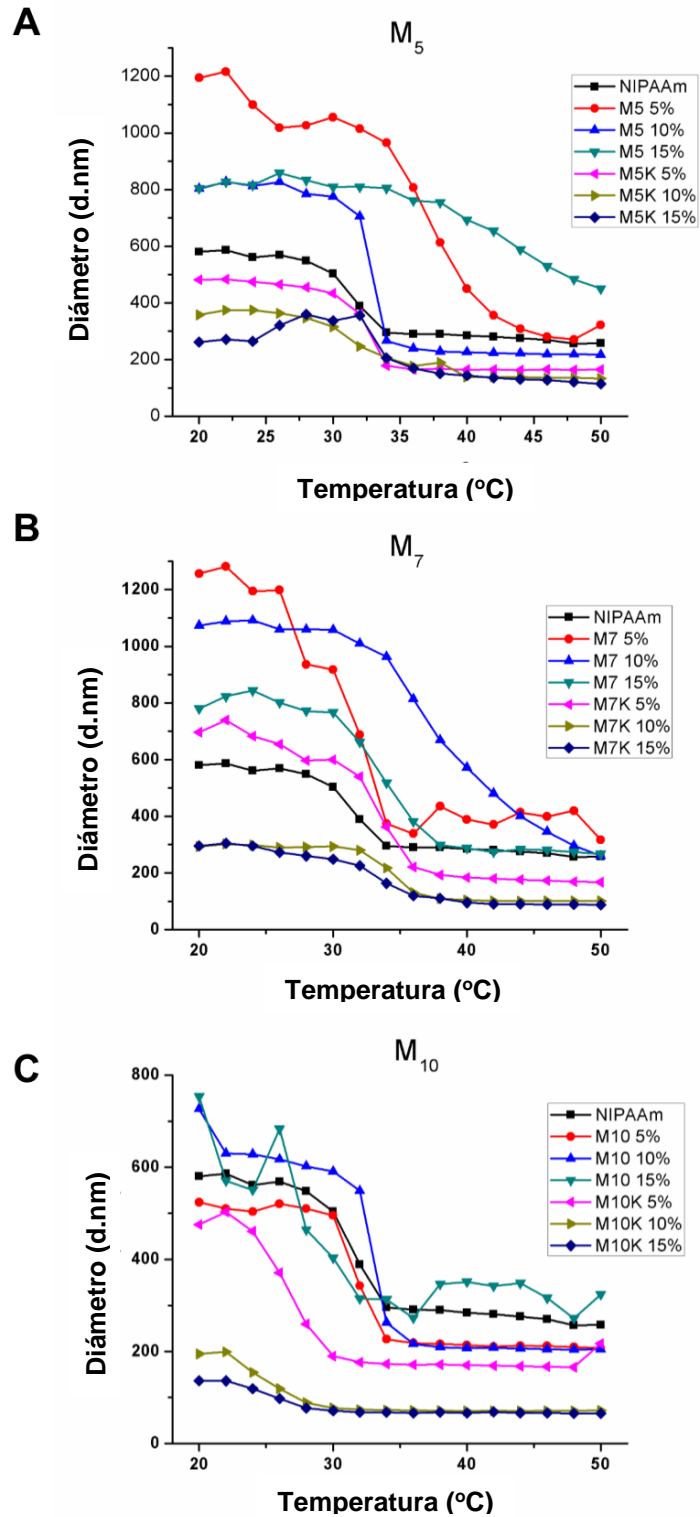


Figura 15. Efecto de temperatura en el tamaño de nanogeles de NIPAAm y NIPAAm:CAM en agua. (A) NIPAAm:M5, (B) NIPAAm:M7 y (C) NIPAAm:M10

En el caso del M5 (FIGURA), su pKa es de 5.2 (Magaña et al., 2017), por lo cual las aglutinaciones se muestran en los pH's ácidos 3 y 5, al encontrarse en su forma no ionizada. Cuando se rebasa su pKa, se observa una tendencia decadente, debido a que la molécula se encuentra ionizada, estabilizando las nanopartículas.

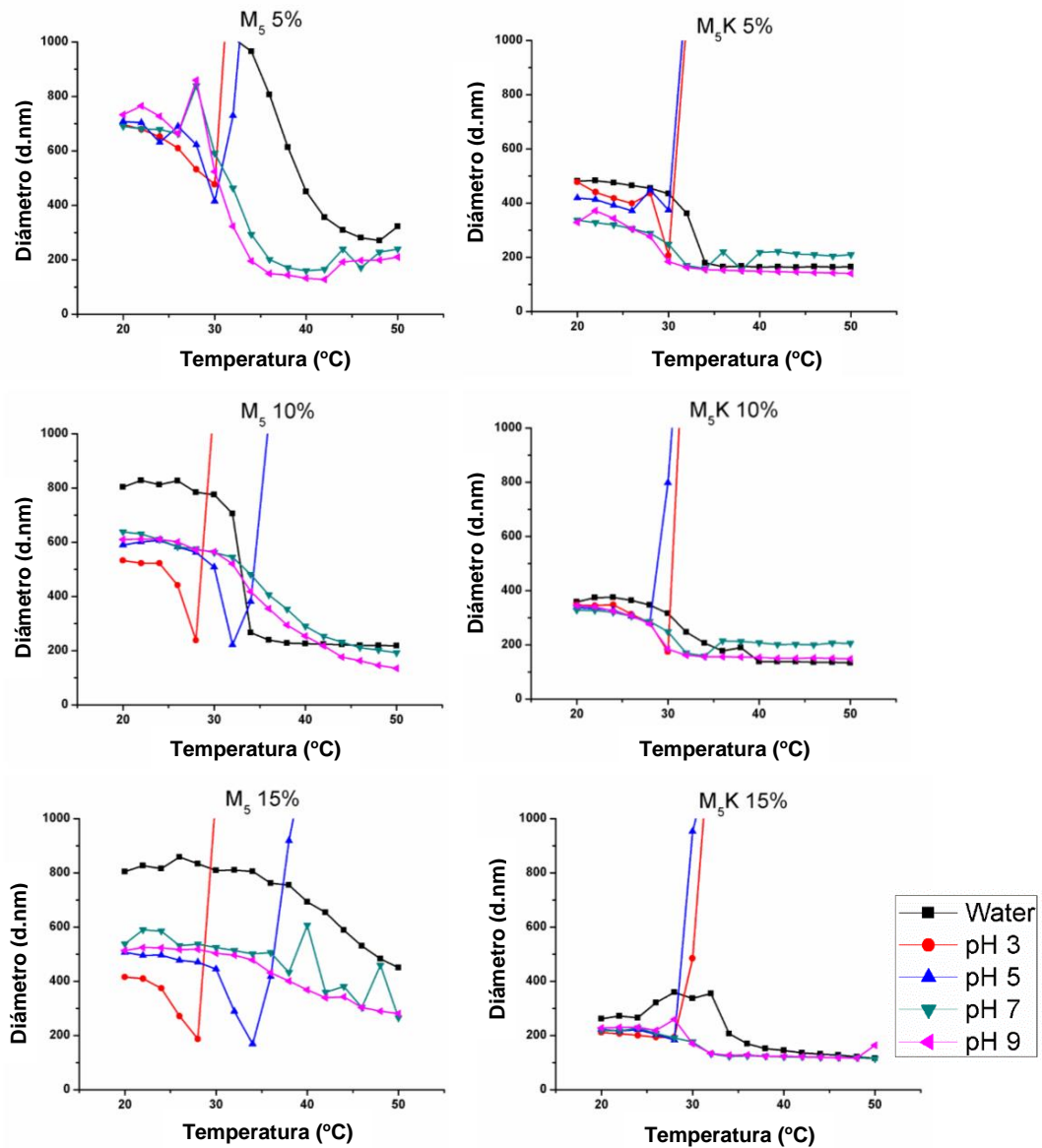


Figura 16. Efecto de temperatura en el tamaño de los nanogeles de NIPAAm:M5 y NIPAAm:M5K en pH de 3 a 9.

De igual manera, con estas mediciones en DLS, fue posible extraer la temperatura de transición, la cual fue adquirida graficando los tamaños obtenidos conforme la temperatura aumentaba, además de que se graficó la derivada de los datos previamente mencionados; en el caso de un incremento radical dentro de la gráfica se hace evidente la transición, sin embargo, en el caso de un incremento lento se toma el punto más alto obtenido en la gráfica de derivadas. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Temperaturas de transición de nanogeles NIPAAm:CAM

Monómero	%	Temperatura de Transición (°C)				
		Agua	pH3	pH5	pH7	pH9
M₅	5	32	32	34	30	30
M₅	10	34	30	36	34	34
M₅	15	28	30	36	38	36
M₅K	5	34	32	32	32	30
M₅K	10	32	32	32	32	30
M₅K	15	34	32	30	32	30
M₇	5	34	34	32	32	30
M₇	10	36	32	32	32	32
M₇	15	32	32	32	34	32
M₇K	5	34	32	32	32	32
M₇K	10	36	30	30	32	32
M₇K	15	34	30	30	32	32
M₁₀	5	32	34	32	32	30
M₁₀	10	34	32	32	32	32
M₁₀	15	28	32	32	34	32
M₁₀K	5	30	30	30	34	32
M₁₀K	10	30	28	28	34	32
M₁₀K	15	30	34	28	34	34

En el caso del monómero M₅, temperaturas variadas desde 30 a 38° C, las variaciones fueron en todas las concentraciones de la parte ácida en los distintos pH's, aunque es importante señalar que se obtuvo la temperatura de pH

a 38° C, esto se dio en pH 7, aunque es necesario ratificar que el pH donde se esperaba el aumento de temperatura para mejoramiento del sistema de liberación era a un pH menor, sin embargo es motivante a que si hay una respuesta a temperaturas altas, y que al ser la parte ácida, hubo una interacción interna entre los dos monómeros (NIPAAm:CAM), que sí alteró la temperatura de transición de la NIPAAm; en el caso de las sales, la temperatura de transición se mantuvo incluso ligeramente por debajo de la temperatura de transición de NIPAAm o en ella, lo que se podría explicar como una interacción superficial del nanogel, generando una estabilidad en la temperatura.

En el caso del M7, se sabe que su pKa es de 6.0, y nuevamente se puede observar una aglomeración en los pH's por debajo del pKa, ya que los nanogeles al estar principalmente no ionizados, interaccionan entre sí, por lo cual se genera una aglutinación. Nuevamente en el caso de los pH's más altos, hay una tendencia decadente, lo cual indica que el nanogel está estable morfológicamente, sin embargo, si hay una afectación a su diámetro, disminuyendo conforme aumenta la temperatura, sufriendo una transición (FIGURA)

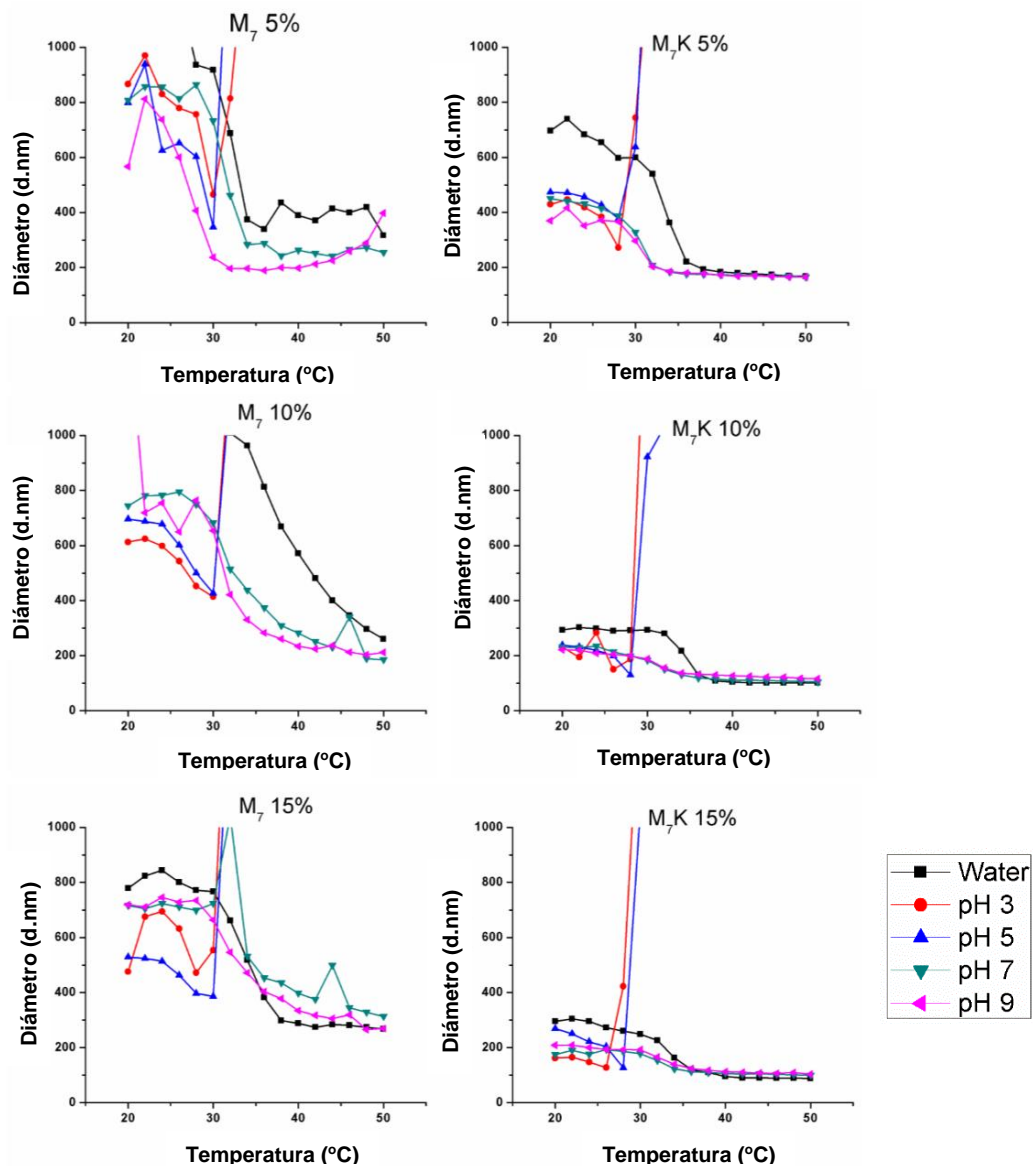


Figura 17. Efecto de temperatura en el tamaño de los nanogeles de NIPAAm:M7 y NIPAAm:M7K en pH de 3 a 9.

Respecto a los cambios en la temperatura de transición del M7 se determinó que en los monómeros copolimerizados con la parte ácida, se mantiene dentro del rango de la temperatura de transición de la NIPAAm, pero a su vez hay ligeros aumentos sobre este rango, cosa que no se puede observar en la sal, donde se mantiene en la temperatura de transición de la NIPAAm.

Al analizar las transiciones del M10, se puede observar que hay tendencias a contraerse en los pH's por arriba de pH 7, debido a que su pKa es de 7, por lo cual se presenta agregación en 3 distintos pH's debido a lo mencionado anteriormente por sus partes parcialmente ionizada y la búsqueda de estabilidad de cargas.

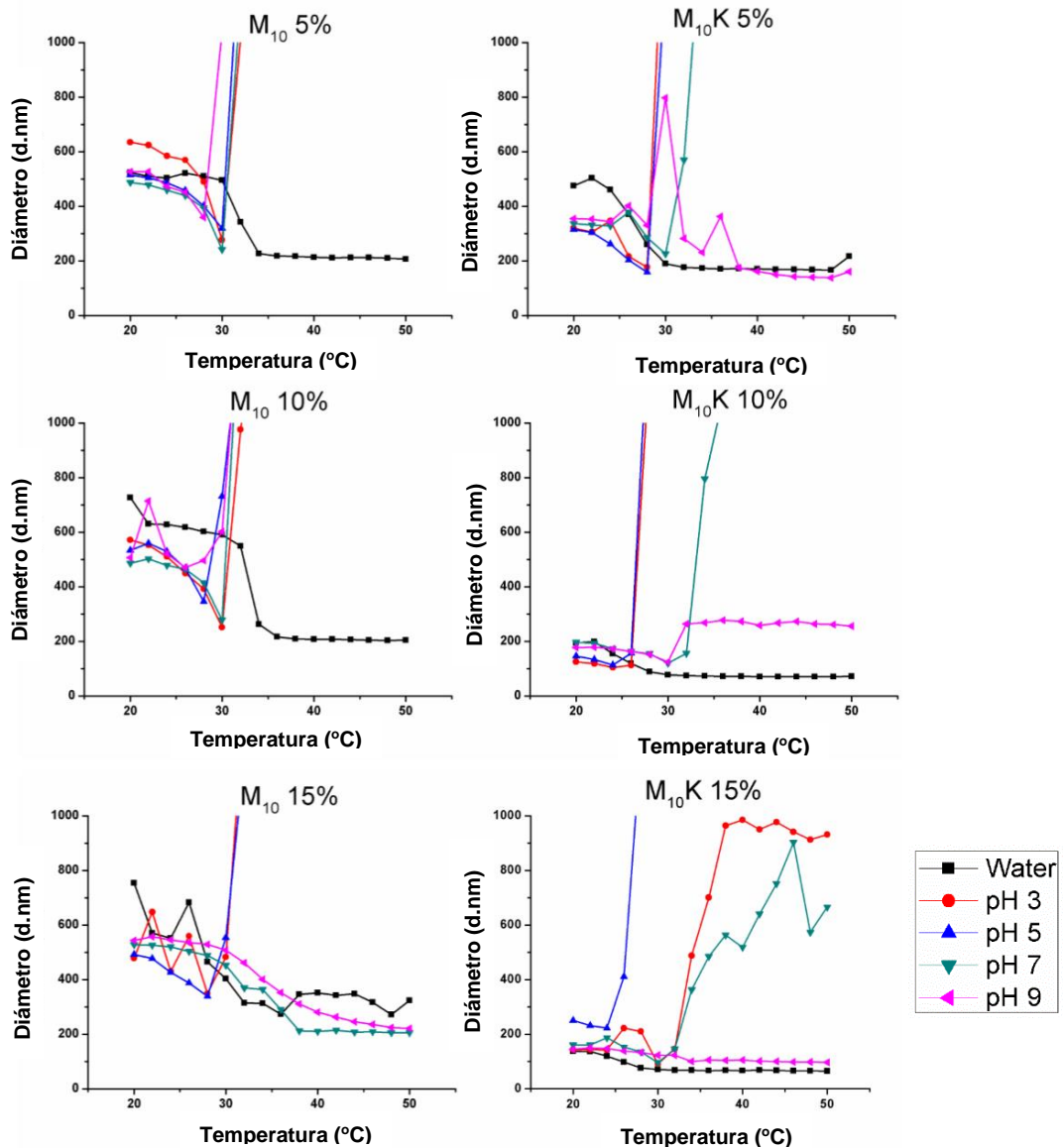


Figura 18. Efecto de temperatura en el tamaño de los nanogeles de NIPAAm:M10 y NIPAAm:M10K en pH de 3 a 9.

Para el caso de las temperaturas de transición de este monómero, en los casos del monómero en parte ácida, hubo una transición levemente aumentada, que indica que el monómero se añadió internamente con el nanogel, afectando parcialmente su transición. A la vez, se puede observar que, en el caso del monómero en forma de sal, la temperatura de transición no varía significativamente, o disminuye, lo cual indica que el monómero se integró por la superficie del nanogel por lo cual no hubo un cambio en su transición.

IV.5.5 Espectrofotometría de infrarrojo

El espectro obtenido por infrarrojo se utilizó con la finalidad de demostrar la copolimerización de los monómeros con NIPAAm; se realizó tomando una muestra de liofilizado de nanogeles, utilizando aquellos que tenían un 15% de monómero/sal.

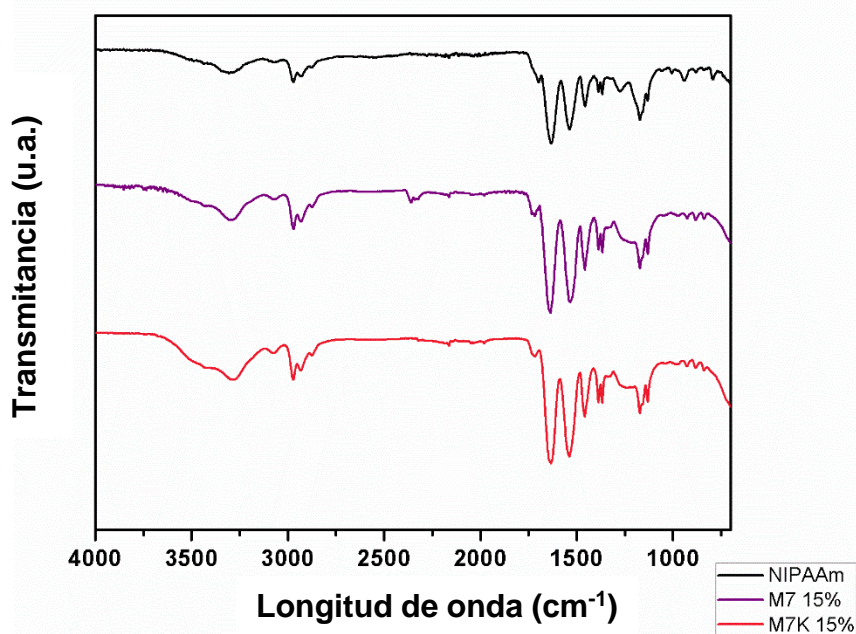


Figura 19. Espectro de infrarrojo de geles de NIPAAm y micro/nanogeles de NIPAAm:M7 y NIPAAm:M7K al 15%

En el espectro de infrarrojo de PNIPAAm aparece una banda a 3600 cm⁻¹ (estiramiento N-H), bandas a 1635 cm⁻¹ y 1537 cm⁻¹, que se deben a la presencia de los grupos amida (amida I y II, respectivamente), en 1385 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones C-H provenientes de -CH(CH₃)₂. Se observa una pequeña banda a 1725 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo del EGDMA.

También se observan los espectros de infrarrojo de los micro/nanogeles M7 15 % y M7K 15%. Se observan bandas similares a los obtenidos con los microgeles de PNIPAAm, excepto que el pico observado en 1725 cm⁻¹ es ligeramente más fuerte, debido a la adición de la señal del carbonilo en el éster de los comonómeros aniónicos. La banda esperada a 1555 cm⁻¹ del grupo carboxilato, se superpone para la señal de la flexión del grupo amida.

Tabla 5. Señales características de grupos funcionales encontrados en PNIPAAm y micro/nanogeles NIPAAm:M7 y NIPAAm:M7K.

Enlaces	Monómeros			cm ⁻¹	Longitud de onda
	PNIPAAm	M7 15%	M7K 15%		
N-H	3255	3292	3284		
C-H	2982	2932	2933		
Amida I	1637	1635	1634		
Amida II	1537	1533	1538		
C=O	1725	1717	1716		
C=C	-	1635	1634		
CH ₃	1434	1457	1458		
CH ₂	-	1386	1386		
CH-	1362	1366	1367		
C-O	-	926	927		

IV.5.6 Determinación del porcentaje de ácido

El contenido de CAM fue determinado a través de una valoración potenciométrica, se pesaron 50 mg de liofilizado de nanogeles, y se diluyeron al 1%. Se le añadió NaOH valorado al 0.05 M, hasta tener un pH de 11, con la finalidad de la ionización completa de los grupos de ácidos carboxílicos; seguido de eso se tituló con HCl valorado al 0.05 M con una micropipeta, hasta obtener un pH de 3. El contenido de CAM fue calculado con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ácido} = \frac{\Delta Vol \text{ tit} * M \text{ tit} * PM \text{ ácido}}{W \text{ muestra (mg)}} * 100$$

Ecuación 2. Fórmula para la obtención del porcentaje de ácido en nanogeles

En la siguiente tabla se pueden observar los resultados obtenidos; inicialmente se muestra el pH inicial de cada uno de los liofilizados, seguido por el porcentaje teórico en peso de cada uno de los monómeros utilizados. El porcentaje calculado se obtuvo a partir del monómero pesado sobre el peso total de todos los reactivos, y finalmente se encuentra el porcentaje obtenido con ayuda de la titulación.

Tabla 6. Porcentaje de ácido obtenido en nanogeles NIPAAm:CAM

Monómero	pH inicial	% teórico	% calculado	% experimental
M ₅	3.73	5	4.47	4.98
M ₅	3.41	10	8.75	4.95
M ₅	3.44	15	13.41	11.42
M ₅ K	4.47	5	4.51	14.19
M ₅ K	4.61	10	9.27	11.18
M ₅ K	4.95	15	13.38	11.44
M ₇	5.19	5	4.55	4.57
M ₇	4.64	10	9.75	6.89
M ₇	6.68	15	13.52	11.99
M ₇ K	4.62	5	4.58	5.28
M ₇ K	5.77	10	9.26	8.48
M ₇ K	5.04	15	13.40	14.49
M ₁₀	4.09	5	4.56	7.77
M ₁₀	5.31	10	8.89	5.43
M ₁₀	4.60	15	13.49	5.90
M ₁₀ K	4.64	5	4.45	4.34
M ₁₀ K	5.65	10	9.00	37.64
M ₁₀ K	5.53	15	13.39	15.38

Se observa que es congruente desde el porcentaje teórico hasta el porcentaje experimental.

IV.5.7 Potencial Z

El potencial Z fue realizado a partir de mediciones en DLS, donde se colocaba 1 ml en la celda, de una dilución previamente preparada al 1%.

Tabla 7. Potencial Z de microgeles y nanogeles de NIPAAm y CAM's.

Monómero	%	Potencial Z
<i>NIPAAm</i>	100	-7.13
<i>M₅</i>	15	-12.2
<i>M₅K</i>	15	-13.6
<i>M₇</i>	15	-12.1
<i>M₇K</i>	15	-14.4
<i>M₁₀</i>	15	-10.2
<i>M₁₀K</i>	15	-19.9

En la tabla, se puede observar que los valores de carga obtenidos para el potencial Z son negativos en todos los casos, incluyendo los microgeles elaborados al 100% con NIPAAm. También se observa que se encuentra más negativo cuando se utiliza la sal de cada monómero, debido a que, al ser más polar, generan mayor carga. El potencial Z fue una herramienta utilizada para saber la carga superficial de las nanopartículas, lo cual es importante debido a que al ser negativo, no generaría una interacción o un complejo con la célula, haciendo más viable el sistema de liberación.

IV.5.8 Microscopía electrónica de barrido FESEM

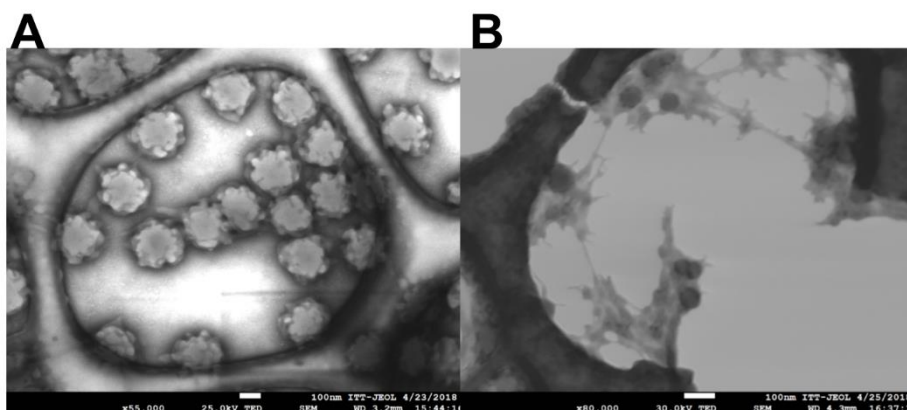


Figura 21. FESEM de nanogeles (A) NIPAAm:M10 y (B) NIPAAm:M10K

La microscopía electrónica de barrido se llevó a cabo con la finalidad de poder observar la morfología y el tamaño de los nanogeles, además de poder corroborar el efecto tensoactivo de la sal, al ser utilizadas como monómero.

La preparación de la muestra colocada en el microscopio electrónico de barrido fue una muestra al 1%, dializada, y teñida con acetato de uranilo. La muestra fue colocada en una rejilla de Cobre y carbono con un Mesh de 400.

Del lado izquierdo, se muestran las nanopartículas elaboradas con el monómero en forma ácida y del lado derecho se observan las nanopartículas elaboradas con la sal potásica del monómero. Se puede observar que en ambos casos se presentan figuras esféricas y los tamaños se correlacionan con el tamaño contraído de los geles.

IV.6 CARGADO DE NANOGELES CON 5-FLUOROURACILO (5-FU).

El cargado de microgeles fue realizado mediante el método de diálisis, el cual consistía en disolver 20 mg de fármaco y 40 mg de microgeles en dimetilacetamida, por separado. Se añadió gota a gota la solución del 5-FU en la solución de geles y se dejó en agitación constante por 12 horas.

La solución se colocó en diálisis por 4 horas, contra agua destilada, donde ésta se cambió cada media hora las primeras 2 horas, y finalmente cada hora hasta completar las 4 horas; la finalidad de la diálisis fue eliminar todo el fármaco libre, para así obtener solamente los microgeles cargados. Al finalizar la diálisis, se colocaron en viales y se congelaron utilizando hielo seco para evitar la formación de cristales de agua en la solución. Para la liofilización se recurrió a mantener el vial en enfriamiento durante un día, así evitando el descongelamiento precoz de la solución.

La determinación del cargado fue realizada a través de la curva de calibración (ANEXO 5), donde se obtuvo que el porcentaje de cargado fue de 11.73%, con una eficiencia de cargado del 32.93%

IV.7 LIBERACIÓN DE NANOGELES CON 5-FLUOROURACILO (5-FU)

La liberación del fármaco se llevó a cabo mediante la utilización de membranas de diálisis, con un corte de 15 kDa usando de medio buffer de 7.4, dejándose en agitación constante con temperatura controlada (a 37° y 25° C), tomándose muestras en los tiempos previamente establecidos (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0, 12 y 24 h). La concentración del fármaco liberado fue calculada con la extrapolación de datos en la curva de calibración (ANEXO 6), y de ahí se calculó el porcentaje del fármaco liberado. La gráfica muestra los resultados obtenidos en la liberación.

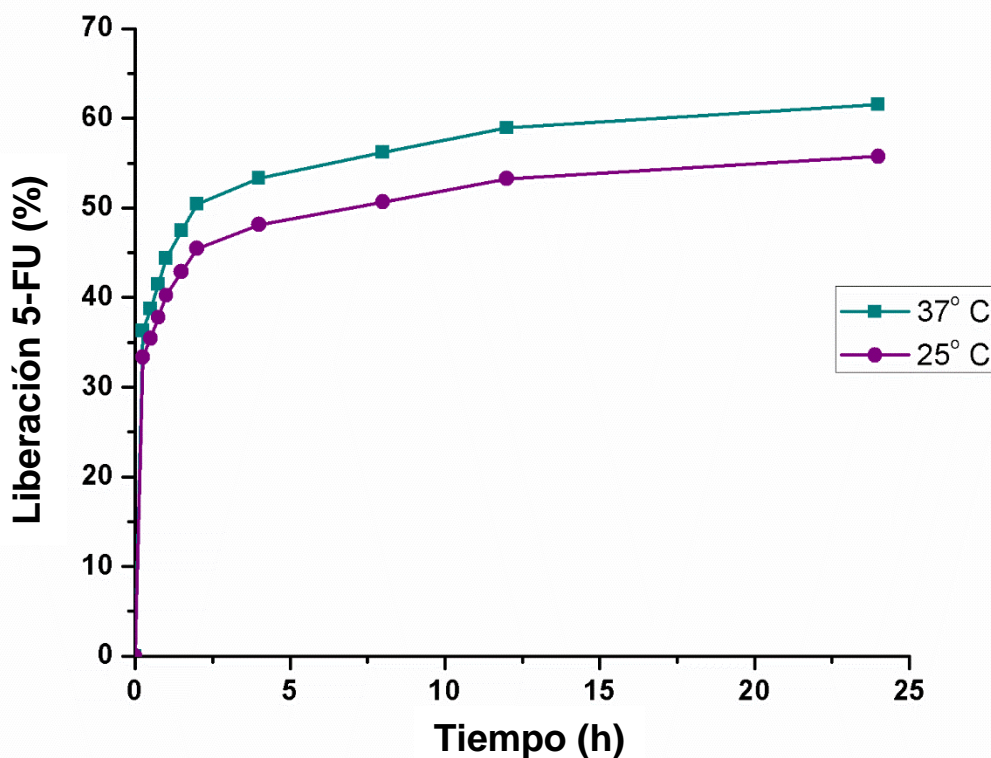


Figura 22. Liberación de 5-Fluorouracilo a 25° C y a 37° C.

En la gráfica, se puede apreciar que, en la liberación, de ambas temperaturas, se obtuvo una respuesta rápida, debido a que a los 90 min se obtuvieron aumentos considerables en las mediciones del 5-FU, y después de las 2 horas la liberación fue lenta y se mantuvo en el mismo rango porcentual. Es importante señalar que en los dos casos no se obtuvo la liberación del 100% del fármaco, la liberación a 25° C tuvo una liberación total de 55.72% a las 24 h, mientras que la liberación a 37° aumentó a 61.53%, lo cual demuestra que las nanopartículas colapsan con el aumento de temperatura, superándose la temperatura de transición del PNIPAAm, mejorando así la liberación del fármaco.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Es posible sintetizar nanogeles a partir de la copolimerización de NIPAAm con carboxialquilmecrilamidas con 5, 7 y 10 metilenos en su cadena lateral, así como con sus respectivas sales potásicas; se pudo observar que en respuesta sobre el diámetro, no hubo cambios significativos al usar la forma ácida del monómero, sin embargo se nota un efecto tensoactivo al usar su forma de sal, que al aumentar la concentración porcentual de la sal, había una reducción significativa en el tamaño, como se pudo observar en el caso del M10, donde se aprecia claramente el efecto tensoactivo, generando un decremento en el diámetro que iba de los 400 a los 100 nm usando los diferentes porcentajes de sal.

Los nanogeles sí tienen respuesta a pH's y a temperatura debido a que las carboxialquilmecrilamidas se encuentran en el núcleo del nanogel, afectando la temperatura de transición, sin embargo, el incremento fue muy leve por arriba de la temperatura de transición de la NIPAAm.

Cabe señalar que los nanogeles a partir de la forma ácida de los tres distintos monómeros tienen una respuesta en el diámetro en la variación de pH, además de que en los casos de los copolimerizados a partir de los monómeros M5, M5K, M7 y M7K, presentan una agregación a pH's ácidos debido a sus pKa, lo que difiere de los nanogeles copolimerizados con M10 y M10K ya que, al tener un pH más alto, presenta agregación hasta pH 7.

La carga de la superficie de las nanopartículas se muestra negativa, lo cual es un buen indicio para una liberación controlada de fármacos, ya que al ser utilizado para una liberación celular, al tener carga negativa se evitaría la formación de complejos o interacción entre célula y nanogel.

La morfología de las partículas es esférica, y se encuentra una buena polidispersión entre ellas, además de que se puede observar y comprobar el cómo el aumento del monómero favorece el efecto tensoactivo dentro de las nanopartículas.

Es posible el cargado de las nanopartículas con 5-Fluorouracilo, por medio de diálisis, obteniéndose porcentajes de cargado de 11.73% con una eficiencia de cargado de 32.93%, además de que en la liberación observó un efecto favorable a temperatura de 37° C, y a su vez, el porcentaje de liberación fue mayor que a 25° C, concluyendo que las nanopartículas si son sensibles a temperatura y muestran una respuesta de mayor colapso cuando se rebasa su temperatura de transición.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

- Abandansari, H. S., Nabid, M. R., Rezaei, S. J. T., & Niknejad, H. (2014). PH-sensitive nanogels based on Boltorn[®] H40 and poly(vinylpyridine) using mini-emulsion polymerization for delivery of hydrophobic anticancer drugs. *Polymer (United Kingdom)*, *55*(16), 3579–3590. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.06.037>
- Arunraj, T. R., Sanoj Rejinold, N., Ashwin Kumar, N., & Jayakumar, R. (2014). Bio-responsive chitin-poly(l-lactic acid) composite nanogels for liver cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *113*, 394–402. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.023>
- Asadi, H., & Khoee, S. (2016). Dual responsive nanogels for intracellular doxorubicin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *511*(1), 424–435. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.037>
- Ballauff, M., & Lu, Y. (2007). “Smart” nanoparticles: Preparation, characterization and applications. *Polymer*, *48*(7), 1815–1823. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.02.004>
- Bearat, H. H., Lee, B. H., & Vernon, B. L. (2012). Comparison of properties between NIPAAm-based simultaneously physically and chemically gelling polymer systems for use in vivo. *Acta Biomaterialia*, *8*(10), 3629–3642. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.012>
- Cao, X. T., Kim, Y. H., Park, J. M., & Lim, K. T. (2016). One-pot syntheses of dual-responsive core cross-linked polymeric micelles and covalently entrapped drug by click chemistry. *European Polymer Journal*, *78*, 264–273. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.03.039>
- Castro-Vidal, D.a.; Obeso-Vera, C.; Suarez-Meraz, K. A.; Lara-Molinero, B. M.;

- Serrano-Medina, A. . C.-B. (2016). Thermal and Ph Sensitive Nano / Microgels of N - Isopropylacrylamide and Carboxyalkyl Methacrylates. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 11(1), 123–132.
- Cuggino, J. C., Molina, M., Wedepohl, S., Igarzabal, C. I. A., Calderón, M., & Gugliotta, L. M. (2016). Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems. *European Polymer Journal*, 78, 14–24. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.02.022>
- Egodawatte, S., Dominguez, S., & Larsen, S. C. (2017). Solvent effects in the development of a drug delivery system for 5-fluorouracil using magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials*, 237, 108–116. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.09.024>
- Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect : Unique features of tumor blood vessels for drug delivery , factors involved , and limitations and augmentation of the effect ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136–151. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- Ge, Y., Ma, Y., & Li, L. (2016). The application of prodrug-based nano-drug delivery strategy in cancer combination therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 482–489. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.051>
- Gong, C., Shan, M., Li, B., & Wu, G. (2016). A pH and redox dual stimuli-responsive poly(amino acid) derivative for controlled drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 396–405. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.038>
- Hu, Q., Sun, W., Wang, C., & Gu, Z. (2016). Recent advances of cocktail

- chemotherapy by combination drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 98, 19–34. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.022>
- Hu, W., Qiu, L., Cheng, L., Hu, Q., Liu, Y., Hu, Z., ... Cheng, L. (2016). Redox and pH dual responsive poly(amidoamine) dendrimer-poly(ethylene glycol) conjugates for intracellular delivery of doxorubicin. *Acta Biomaterialia*, 36, 241–253. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.027>
- Jhaveri, A., Deshpande, P., & Torchilin, V. (2014). Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 190, 352–370. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.002>
- Kost, J., & Langer, R. (2012). Responsive polymeric delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 327–341. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.014>
- Kyong, M., Kiel, Y., Moo, Y., & Su, C. (1998). Effect of polymer complex formation on the cloud-point of poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) in the poly (NIPAAm-co-acrylic acid): polyelectrolyte complex between poly (acrylic acid) and poly (L -lysine), 39(16), 3703–3708.
- Lee, W. F., & Yeh, Y. C. (2005). Studies on preparation and properties of NIPAAm/hydrophobic monomer copolymeric hydrogels. *European Polymer Journal*, 41(10), 2488–2495. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.04.038>
- Li, L., Chen, L., Zhang, H., Yang, Y., Liu, X., & Chen, Y. (2016). Temperature and magnetism bi-responsive molecularly imprinted polymers: Preparation, adsorption mechanism and properties as drug delivery system for sustained release of 5-fluorouracil. *Materials Science and Engineering C*, 61, 158–168. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.027>

- Li, M., Tang, Z., Sun, H., Ding, J., Song, W., & Chen, X. (2013). pH and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery†. *Polymer Chemistry*, 4, 1199–1207. <http://doi.org/10.1039/c2py20871g>
- Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A., & Liang, X. (2014). pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 32(4), 693–710. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.009>
- Magaña, H., Cornejo-Bravo, J. M., Cordova-Guerrero, I., Palomino, K., & Serrano-Medina, A. (2017). pH-dependent release of antihypertensives from complexes with poly (carboxyalkyl methacrylamides). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39, 508–515. <http://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.008>
- Mauri, E., Moroni, I., Magagnin, L., Masi, M., Sacchetti, A., & Rossi, F. (2016). Comparison between two different click strategies to synthesize fluorescent nanogels for therapeutic applications. *Reactive and Functional Polymers*, 105, 35–44. <http://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.007>
- Miao, L., Hu, J., Lu, M., Tu, Y., Chen, X., Li, Y., ... Hu, S. (2016). Alkynyl-functionalization of hydroxypropyl cellulose and thermoresponsive hydrogel thereof prepared with P(NIPAAm-co-HEMA/PCL). *Carbohydrate Polymers*, 137, 433–440. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.001>
- Minghong, W., Bao, B., Chen, J., Xu, Y., Zhou, S., & Ma, Z. T. (1999). Preparation of thermosensitive hydrogel (PP-g-NIPAAm) with one-off switching for controlled release of drugs. *Radiation Physics and Chemistry*, 56(3), 341–346. [http://doi.org/10.1016/S0969-806X\(99\)00196-6](http://doi.org/10.1016/S0969-806X(99)00196-6)

- Musial, W., Gaszytch, M., Kokol, V., Mucha, I., Malamis, A., Kolodziejczyk, W., & Gola, A. (2017). INFLUENCE OF LIPOPHILIC AND HYDROPHILIC CO-MONOMERS ON THE HYDRODYNAMIC DIAMETER OF THERMOSENSITIVE NIPA DERIVATIVES FOR THERMALLY CONTROLLED DRUG DELIVERY, *74*(1), 199–209.
- Ndong Ntoutoume, G. M. a., Granet, R., Mbakidi, J. P., Brégier, F., Léger, D. Y., Fidanzi-Dugas, C., ... Sol, V. (2015). Development of curcumin–cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes: New anticancer drug delivery systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *26*(3), 941–945. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.060>
- Norouzi, M., Nazari, B., & Miller, D. W. (2016). Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discovery Today*, *21*(11), 1835–1849. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.07.006>
- Palomino, K., Suarez-Meraz, K. A., Serrano-Medina, A., Olivas, A., Samano, E. C., & Cornejo-Bravo, J. M. (2015). Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery. *Journal of Polymer Research*, *22*(10). <http://doi.org/10.1007/s10965-015-0841-0>
- Pan, Q., Lv, Y., Williams, G. R., Tao, L., Yang, H., Li, H., & Zhu, L. (2016). Lactobionic acid and carboxymethyl chitosan functionalized graphene oxide nanocomposites as targeted anticancer drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 812–820. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.024>
- Pelton, R. (2000). Temperature-sensitive aqueous microgels. *Advances in*

Colloid and Interface Science, 85(1), 1–33. [http://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00023-8](http://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00023-8)

Prabhakarandian, B., Shen, M. C., Nichols, J. B., Garson, C. J., Mills, I. R., Matar, M. M., ... Pant, K. (2015). Synthetic tumor networks for screening drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 201, 49–55. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.018>

Rajan, M., Murugan, M., Ponnamma, D., Sadasivuni, K. K., & Munusamy, M. A. (2016). Poly-carboxylic acids functionalized chitosan nanocarriers for controlled and targeted anti-cancer drug delivery. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 201–211. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.026>

Rejinold, N. S., Baby, T., Chennazhi, K. P., & Jayakumar, R. (2014). Dual drug encapsulated thermo-sensitive fibrinogen-graft-poly (N-isopropyl acrylamide) nanogels for breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 209–217. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.015>

Sakai, T. (2008). Surfactant-free emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 13(4), 228–235. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.11.013>

Serrano-Medina, A., Cornejo-Bravo, J. M., & Licea-Claveríe, A. (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://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.045>

Setiyorini, Y., Lou, X., & Pintowantoro, S. (2012). The Influence of Temperature and Drug Concentrations Prednisolone in {NIPAAm} Copolymer. *Procedia Chemistry*, 4(0), 336–342.

<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2012.06.047>

Shibuya, K., Nagao, D., Ishii, H., & Konno, M. (2014). Advanced soap-free emulsion polymerization for highly pure, micron-sized, monodisperse polymer particles. *Polymer (United Kingdom)*, *55*(2), 535–539. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.12.039>

Soares, P. I. P., Sousa, A. I., Silva, J. C., Ferreira, I. M. M., Novo, C. M. M., & Borges, J. P. (2016). Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. *Carbohydrate Polymers*, *147*, 304–312. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.028>

Soni, G., & Yadav, K. S. (2016). Nanogels as potential nanomedicine carrier for treatment of cancer: A mini review of the state of the art. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *24*(2), 133–139. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.04.001>

Sultana, F., Manirujjaman, Imran-Ul-Haque, Arafat, M., & Sharmin, S. (2013). An overview of nanogel drug delivery system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(8 SUPPL), 95–105. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2013.38.S15>

Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(2), 157–170. <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>

Wang, K., Yuan, A., Yu, J., Wu, J., & Hu, Y. (2016). One-Step Self-Assembling Method to Prepare Dual-Functional Transferrin Nanoparticles for Antitumor Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(3), 1269–1276.

<http://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.007>

Yao, J., Feng, J., Gao, X., Wei, D., Kang, T., Zhu, Q., ... Chen, J. (2017).

Neovasculature and circulating tumor cells dual-targeting nanoparticles for the treatment of the highly-invasive breast cancer. *Biomaterials*, 113, 1–17.

<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.033>

Yoo, M. K., Sung, Y. K., Lee, Y. M., & Cho, C. S. (2000). Effect of polyelectrolyte

on the lower critical solution temperature of poly (N -isopropyl acrylamide) in the poly (NIPAAm- co -acrylic acid) hydrogel, 41, 5713–5719.

Zhou, T., Xiao, C., Fan, J., Chen, S., Shen, J., Wu, W., & Zhou, S. (2013). A

nanogel of on-site tunable pH-response for efficient anticancer drug delivery.

Acta Biomaterialia, 9(1), 4546–4557.

<http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.017>

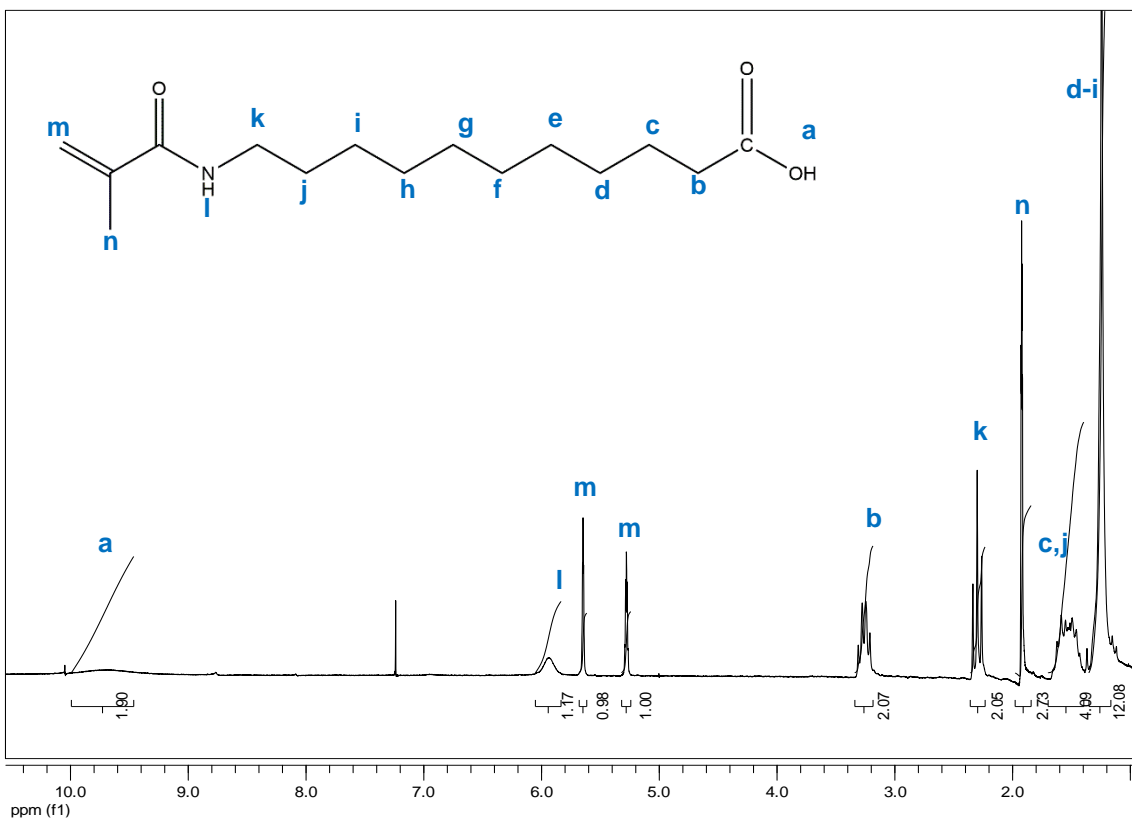
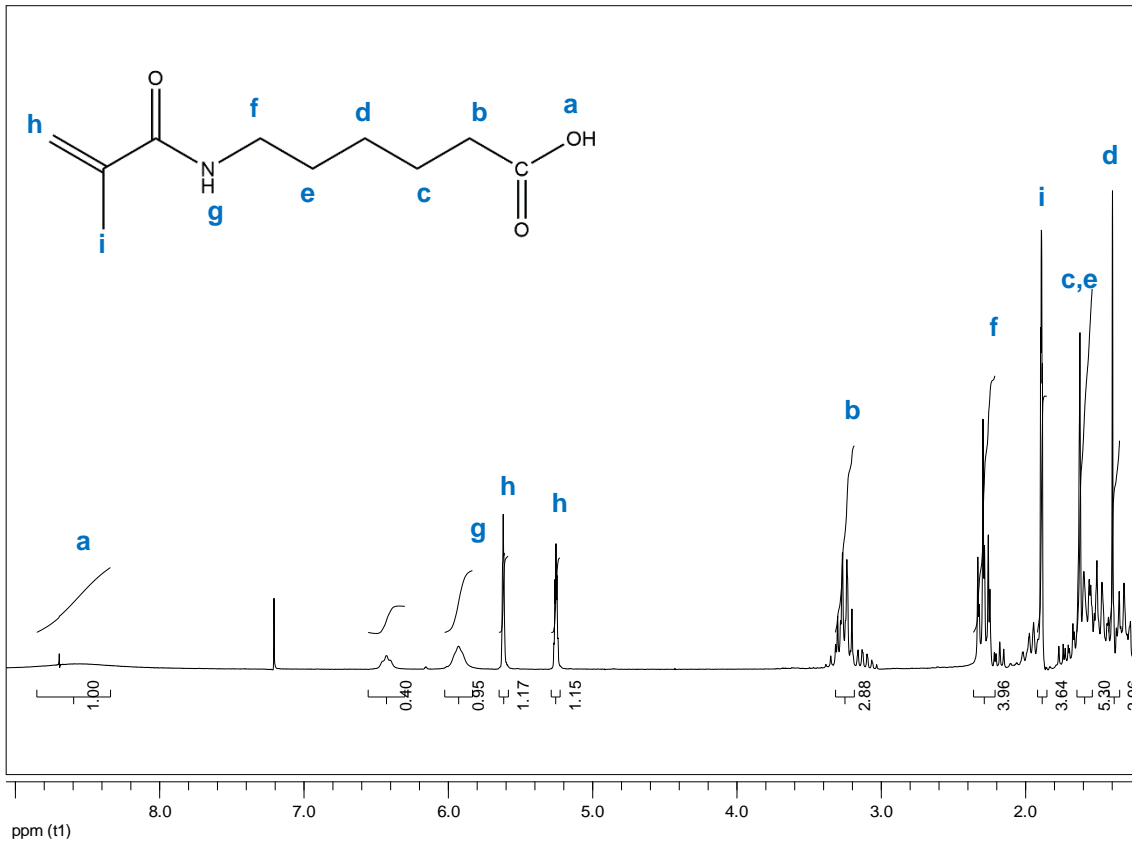
Zhu, X., Sun, Y., Chen, D., Li, J., Dong, X., Wang, J., ... Li, W. (2017).

Mastocarcinoma therapy synergistically promoted by lysosome dependent apoptosis specifically evoked by 5-Fu@nanogel system with passive targeting and pH activatable dual function. *Journal of Controlled Release*, 254(March), 107–118. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.038>

CAPÍTULO VII

ANEXOS

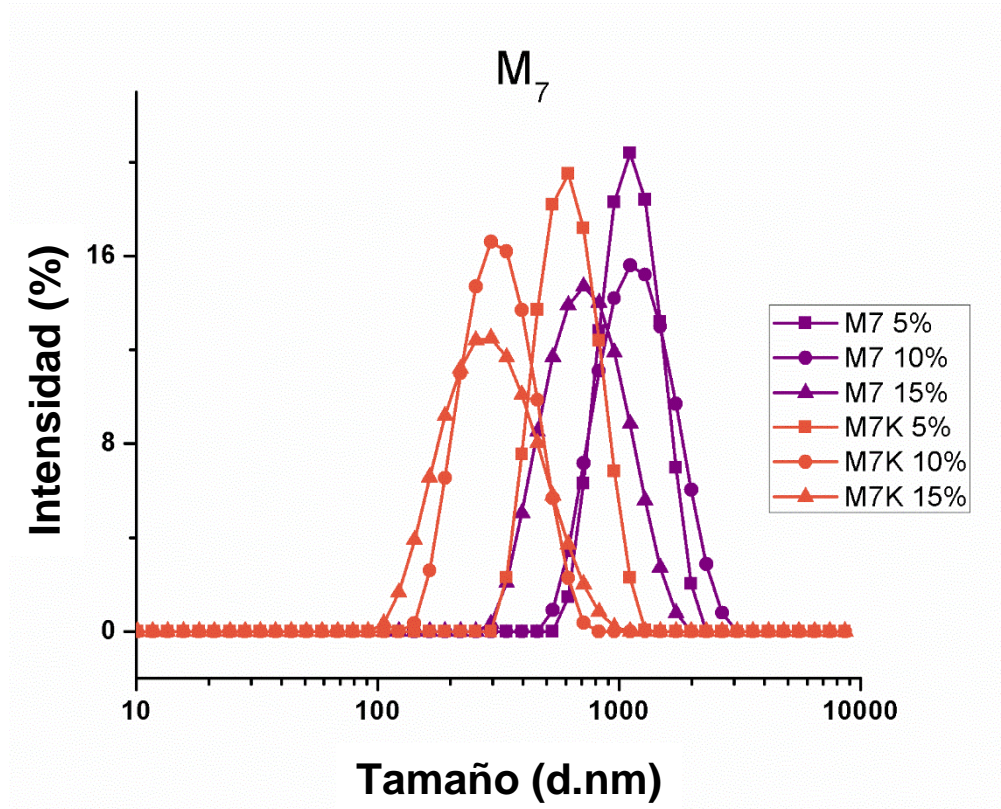
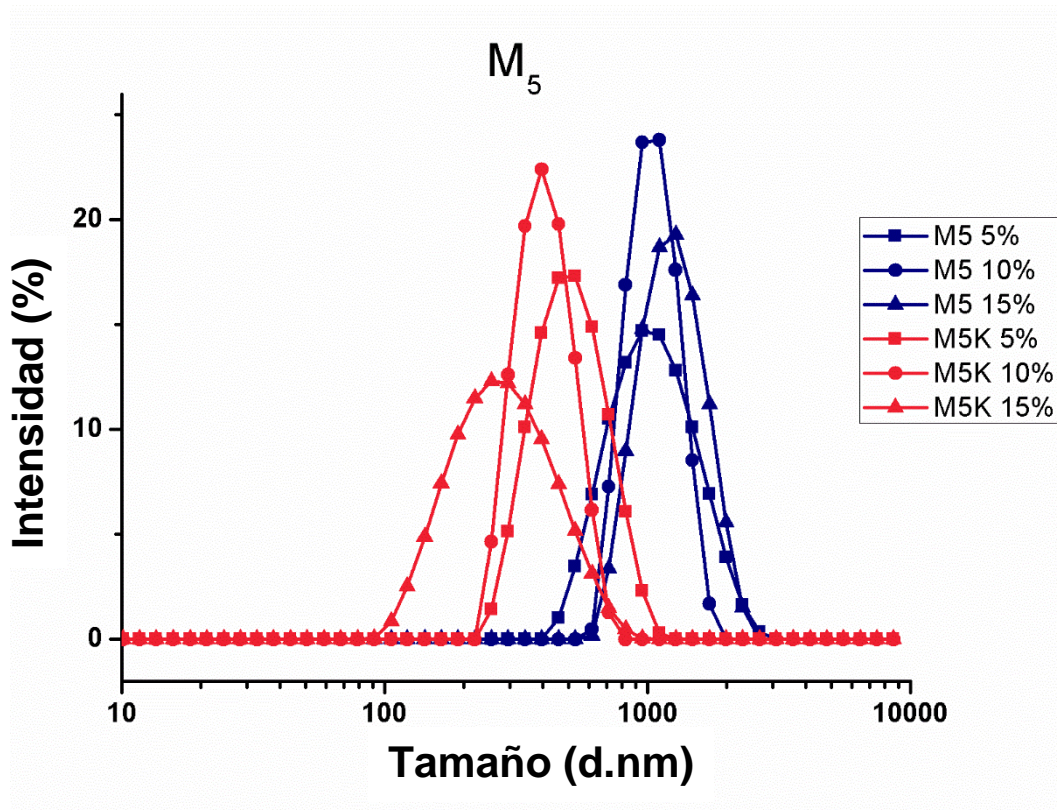
ANEXO 1: Resonancia Magnética nuclear de protón de M5 y M10



ANEXO 2: Tabla de resultados de diámetro en diálisis: M5, M7 y M10.

Monómero	%	Diámetro (d.nm)	pDI
M ₅	5	937.3	0.19
M ₅	10	986.1	0.052
M ₅	15	798.3	0.028
M ₅ K	5	472.3	0.104
M ₅ K	10	374.2	0.185
M ₅ K	15	249.6	0.179
M ₇	5	1027	0.125
M ₇	10	1048	0.142
M ₇	15	975.8	0.19
M ₇ K	5	548.9	0.102
M ₇ K	10	275.3	0.173
M ₇ K	15	274.4	0.187
M ₁₀	5	560.5	0.046
M ₁₀	10	593.6	0.154
M ₁₀	15	499.4	0.037
M ₁₀ K	5	421.7	0.127
M ₁₀ K	10	170.4	0.141
M ₁₀ K	15	91.1	0.184

ANEXO 3: Gráficas de dispersión de diámetro en monómeros y sales de M5 y M7.

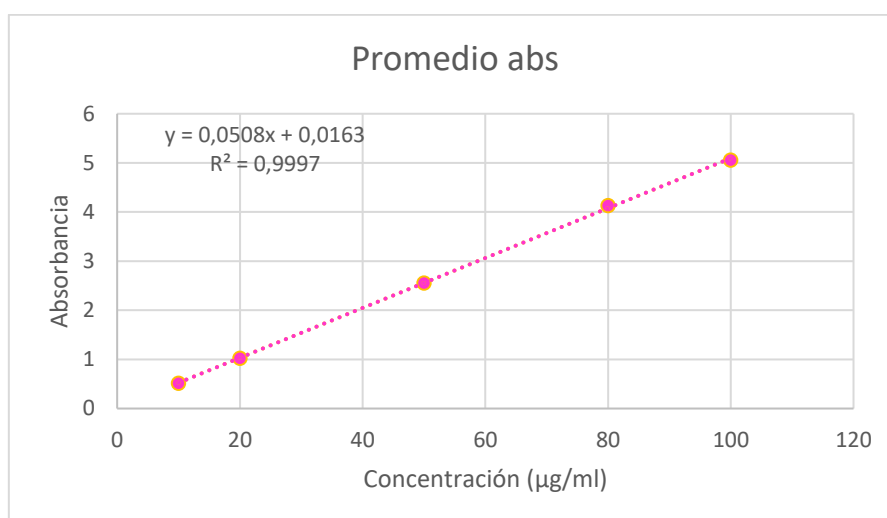


ANEXO 4: Tabla de diámetros y % de rendimiento en resuspensión de nano/micropartículas.

Monómero	%	Tamaño 25°C (d.nm)	pDI
M ₅	5	1186	0.175
M ₅	10	837.5	0.126
M ₅	15	738.4	0.085
M ₅ K	5	528.1	0.257
M ₅ K	10	385	0.122
M ₅ K	15	264.8	0.107
M ₇	5	1032	0.117
M ₇	10	1074	0.163
M ₇	15	690.5	0.116
M ₇ K	5	600.2	0.163
M ₇ K	10	288.7	0.135
M ₇ K	15	262.2	0.195
M ₁₀	5	506.8	0.131
M ₁₀	10	656.9	0.212
M ₁₀	15	560.3	0.18
M ₁₀ K	5	392.4	0.191
M ₁₀ K	10	146.6	0.205
M ₁₀ K	15	110.4	0.253

ANEXO 5: Curva de calibración para cargado de 5-Fluorouracilo.

Curva calibración	
Concentración (µg/ml)	Absorbancia
10	0.5190
20	1.0250
50	2.5550
80	4.1317
100	5.0550



ANEXO 6: Curva de calibración para liberación de 5-Fluorouracilo.

Curva de calibración	
Concentración µg/ml	Absorbancia
2	0.095
5	0.239
10	0.472
20	0.945
50	2.382
80	3.76
100	4.72

