

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



“Síntesis de nanogeles de P-NIPAAm-co-P-(1-vinilimidazol) y P-NIPAAm-co-P-(4-vinilpiridina) sensibles a la temperatura y al pH como sistema de liberación de fármacos”

TESIS

Para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

Presenta

Luis Antonio Sotelo Marmolejo

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Aracely Serrano Medina

CODIRECTOR:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana, B.C. marzo 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

FOLIO No. 054

Tijuana, Baja California, a 17 de febrero de 2023


C. LUIS ANTONIO SOTELO MARMOLEJO
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTE:

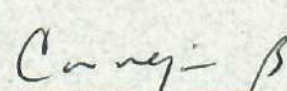
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
opción de Tesis


Es propuesto, por la Dra. Aracely Serrano Medina y el Dr. José Manuel Cornejo Bravo quienes
serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Síntesis
de nanogeles de P-NIPAAm-co-P-(1-vinilimidazol) y P-NIPAAm-co-P-(4-vinilpiridina) sensibles a
la temperatura y al pH como sistema de liberación de fármacos", el cual deberá usted
desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:


- RESUMEN
- I. AGRADECIMIENTOS
 - II. ÍNDICE
 - III. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
 - IV. LISTA DE TABLAS
 - V. LISTA DE FIGURAS
 - VI. RESUMEN
 - VII. INTRODUCCIÓN
 - VIII. TEORÍA EN GENERAL
 - IX. PARTE EXPERIMENTAL
 - X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 - XI. CONCLUSIONES
 - XII. REFERENCIAS
 - XIII. ANEXOS




Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co- Director de Tesis


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora

Índice

Agradecimientos	i
Índice	iii
Lista de símbolos y abreviaturas	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
<i>CAPITULO I RESUMEN</i>	1
<i>CAPÍTULO II INTRODUCCIÓN</i>	4
II.1 Antecedentes	7
II.2 Justificación	9
II.3 Objetivos	11
II.3.1 Objetivo general	11
II.3.2 Objetivos específicos	11
<i>CAPITULO III TEORÍA GENERAL</i>	12
III.1 Sistemas de liberación de medicamentos	13
III.1.1 Sistemas de liberación controlada	13
III.1.2 Sistemas de liberación dirigida	14
III.1.2.1 Direccionamiento pasivo	14
III.1.2.2 Direccionamiento activo	15
III.2 Polímeros	16

III.2.1 Monómeros	17
III.2.2 Polimerización	17
III.2.2.1 Estructura polimérica	18
III.2.2.2 Homopolímeros y copolímeros	19
III.2.2.2.1 Tipos de copolímeros	19
III.2.3 Polímeros inteligentes	20
III.2.3.1 Polímeros sensibles a la temperatura	21
III.2.3.1.1 N-isopropilacrilamida	21
III.2.3.2 Polímeros sensibles al pH	22
III.2.3.2.1 1-Vinilimidazol	23
III.2.3.2.1 4-Vinilpiridina	24
III.3 Nanotecnología	25
III.3.1 Nanomedicina	26
III.3.2 Nanopartículas como sistemas de liberación	27
CAPITULO IV PARTE EXPERIMENTAL	28
IV.1 Equipos y reactivos	29
IV.1.1 Equipos	29
IV.1.2 Reactivos	29
IV.2 Purificación de N-isopropilacrilamida	30
IV.3 Remoción de inhibidores	30
IV.4 Síntesis de nanopartículas	31
IV.5 Purificación por diálisis.	32

IV.6 Mediciones en ZetaSizer Nano-ZS (DLS)	32
IV.7 Liofilización	33
IV.8 Reconstitución del liofilizado	34
IV.9 Caracterización por FT-IR	34
CAPITULO V RESULTADOS y DISCUSION	35
V.1 Síntesis de nanopartículas de NIPAAm/VI, NIPAAm/VP y NIPAAm/VI/VP	36
<hr/>	
V.1.1 Componentes	36
V.1.1 Rendimiento de reacción	36
V.1.2 Liofilizado y preparación.	37
V.2 Caracterización de nanopartículas de NIPAAm/VI, NIPAAm/VP y NIPAAm/VI/VP	38
<hr/>	
V.2.1 Tamaño de partícula	38
V.2.2 Análisis por FT-IR	41
V.2.3 Potencial zeta	45
V.3 Evaluación del efecto de la temperatura y el pH.	48
V.3.1 Efecto de la temperatura	48
V.3.2 Efecto del pH	50
V.3.3 Efecto de la temperatura y el pH.	55
CAPITULO VI CONCLUSIONES	59
CAPITULO VII REFERENCIAS	62

Lista de símbolos y abreviaturas

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIMBOLOGÍA

1-VI o VI	1-Vinilimidazol
2MBA	Ácido 2-metacrilóiloxibenzoico
4-VP o VP	4-Vinilpiridina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNip	ARN interferente pequeño
DE	Desviación estándar
DLS	Dispersión de luz dinámica
DVA	Divinil acetal
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EPR	Permeabilidad y retención aumentada
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
NIPAAm o NI	N-isopropilacrilamida
Nm	Nanómetros
PDI	Índice de polidispersidad
PEGMA	Poli(etilenglicol) metil éter metacrilato
pH	Potencial de hidrogeno
PZ	Potencial zeta
STEM	Microscopía electrónica de barrido de transmisión

Ttr	Temperatura de transición
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VPF	Factor de permeabilidad vascular
Z-ave	Z-average

Lista de tablas

TABLA 1. TIPOS DE COPOLÍMEROS Y SU ESTRUCTURA.	20
TABLA 2. PROPORCIÓN DE LOS COMPONENTES DE CADA FORMULACIÓN.	36
TABLA 3. RENDIMIENTO DE REACCIÓN DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES.....	37
TABLA 4. TAMAÑO DE LAS FORMULACIONES ANTES Y DESPUÉS DE LIOFILIZAR.....	38
TABLA 5. POTENCIALES ZETA Y SUS RESPECTIVAS DESVIACIONES ESTÁNDAR.....	45
TABLA 6. COMPONENTES DE FORMULACIÓN NIPAAM/VI 10%.....	67
TABLA 7. COMPONENTES DE FORMULACIÓN NIPAAM/VP 10%.....	67
TABLA 8. COMPONENTES DE FORMULACIÓN NIPAAM/VI/VP 5%/5%.	67
TABLA 9. TEMPERATURAS DE TRANSICIÓN DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES A DIFERENTES PH.....	68

Lista de figuras

FIGURA 1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN FUNCIÓN DE SU LIBERACIÓN	14
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL DIRECCIONAMIENTO ACTIVO Y PASIVO DE NANOESTRUCTURAS	15
FIGURA 3. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIE PARA LA DIRECCIÓN ACTIVA	16
FIGURA 4. DISTINTOS TIPOS DE POLÍMEROS.	17
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS POLIMÉRICAS.....	18
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE NIPAAAM Y P(NIPAAAM).....	22
FIGURA 7. DIFERENCIA DE PH EN TEJIDO SANO Y TUMORAL (INFLAMACIÓN)	23
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE 1-VINILIMIDAZOL Y P(1-VINILIMIDAZOL).....	24
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE 4-VINILPIRIDINA Y P(4-VINILPIRIDINA)	25
FIGURA 9. NANOESCALA Y NANOESTRUCTURAS APLICABLES	26
FIGURA 10. PURIFICACIÓN DE NIPAAAM.	30
FIGURA 11. CELDAS UTILIZADAS PARA MEDICIONES DE TAMAÑO Y POTENCIAL ZETA.	32
FIGURA 12. EQUIPO ZETASIZER NANO-SZ	33
FIGURA 13. NANOPARTÍCULAS A) ANTES DE LIOFILIZAR, B) LIOFILIZADAS Y C) RESUSPENDIDAS.	37
FIGURA 14. GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MICROGELES DE NIPAAAM/VI 10% ANTES Y DESPUÉS DE LIOFILIZAR.	39
FIGURA 15. GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MICROGELES DE NIPAAAM/VP 10% ANTES Y DESPUÉS DE LIOFILIZAR.....	40
FIGURA 16. GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MICROGELES DE NIPAAAM/VI/VP 5%/5% ANTES Y DESPUÉS DE LIOFILIZAR.	41

FIGURA 17. ESPECTRO FT-IR DE NIPAAAM/VI 10%.....	43
FIGURA 18. ESPECTRO FT-IR DE NIPAAAM/4-VP 10%.....	44
FIGURA 19. ESPECTRO FT-IR DE NIPAAAM/VI/4-VP 5%/5%.	44
FIGURA 20. POTENCIAL ZETA DE NIPAAAM/VI 10%.....	46
FIGURA 21. POTENCIAL ZETA DE NIPAAAM/VP 10%.....	47
FIGURA 22. POTENCIAL ZETA DE NIPAAAM/VI/VP 5%/5%.	47
FIGURA 23. ESTUDIO DE TAMAÑO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE NIPAAAM/VI 10%. .	49
FIGURA 24. ESTUDIO DE TAMAÑO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE NIPAAAM/VP 10%. .	49
FIGURA 25. ESTUDIO DE TAMAÑO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE NIPAAAM/VI/VP 5%/5%.....	50
FIGURA 26. GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE NIPAAAM/VI 10% EN DISTINTAS CONDICIONES DE PH.....	52
FIGURA 27. GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE NIPAAAM/VP 10% EN DISTINTAS CONDICIONES DE PH.....	52
FIGURA 28. GRÁFICA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE NIPAAAM/VI/VP 5%/5% EN DISTINTAS CONDICIONES DE PH.	53
FIGURA 29. GRAFICA DE TAMAÑO CONTRA PH DE NIPAAAM/VI 10%.....	53
FIGURA 30. GRAFICA DE TAMAÑO CONTRA PH DE NIPAAAM/VP 10%	54
FIGURA 31. GRAFICA DE TAMAÑO CONTRA PH DE NIPAAAM/VI/VP 5%/5%.....	54
FIGURA 32. ESTUDIO DE TAMAÑO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE NIPAAAM/VI 10% EN DISTINTAS CONDICIONES DE PH.....	55
FIGURA 33. ESTUDIO DE TAMAÑO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE NIPAAAM/VP 10% EN DISTINTAS CONDICIONES DE PH.....	56

FIGURA 34. ESTUDIO DE TAMAÑO CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE NIPAAM/VI/VP
5%/5% EN DISTINTAS CONDICIONES DE PH..... 58

CAPITULO I RESUMEN

El presente proyecto de investigación comprende el desarrollo de nanopartículas poliméricas utilizando NIPAAm como monómero principal debido a sus cualidades termorresponsivas, la cualidad de este monómero para presentar un colapso de tamaño al aumentar la temperatura por encima su temperatura de transición, esta se encuentra a los 32°C lo que lo hacen un polímero con gran utilidad clínica, mediante la copolimerización con distintos monómeros se busca modificar esta temperatura de transición para que el fenómeno de transición ocurra en condiciones fisiológicas para controlar la liberación de fármacos.

Se utilizaron como comonómeros a 1-vinilimidazol y 4-vinilpiridina los cuales son vinilaminas terciarias que presentan sensibilidad al pH al poseer grupos ionizables y cuaternizables, este tipo de polímeros tiene grandes aplicaciones biomédicas debido a que presentan cambios estructurales en respuesta a la temperatura y pH de diferentes condiciones patológicas como artritis reumatoide, cáncer, Alzheimer, entre otras.

El método de síntesis utilizado fue por medio de polimerización en emulsión sin detergente mediante el uso de PEGMA como estabilizante, EGDMA como entrecruzante y APS como iniciador aniónico, el ajuste de proporciones para los comonómeros se realizó a 10% molar con respecto a NIPAAm y PEGMA,

Se realizó la caracterización de las distintas formulaciones en términos de rendimiento y estabilidad frente al proceso de liofilizado. Para corroborar la correcta polimerización se utilizó la técnica de FT-IR junto con la identificación de bandas características de los componentes. El análisis de tamaño de partícula se ejecutó mediante dispersión de luz dinámica obteniéndose valores desde 203 nm hasta 249 nm,

con distribuciones unimodales, se identificó al punto isoeléctrico de las nanopartículas obtenidas en el intervalo de pH 5-6 mediante el estudio del potencial zeta.

Se demostró la sensibilidad dual del sistema al realizar estudios frente a distintas condiciones de temperatura y pH. Se identificó la tendencia de colapso de las distintas formulaciones a medida que aumenta la temperatura y el desplazamiento de la temperatura de transición al darse variaciones en el medio, estas modificaciones se dieron de manera positiva al acercarse a la temperatura corporal con valores de 36-38°C en condiciones de pH 5.0 lo cual tiene gran utilidad debido a las condiciones de acidez generadas en microambientes tumorales o tejidos inflamados¹⁻³.

Gracias a los resultados obtenidos se busca utilizar este sistema como un nanoacarreador con posibles aplicaciones para la liberación controlada de fármacos y terapia genética en pacientes oncológicos y otras patologías.

CAPÍTULO II INTRODUCCIÓN

La biofarmacia es una rama de la farmacología que ha tomado mayor relevancia en la actualidad debido a los avances tecnológicos en la industria, el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a fármacos que se han utilizado de la misma manera durante décadas resulta en un área de investigación con gran potencial para revolucionar la industria farmacéutica al verse involucrada con distintas áreas ⁴.

El desarrollo de sistemas de liberación controlada ha tenido distintos enfoques entre los cuales se destacan el desarrollo de revestimientos sensibles a condiciones como el pH, adaptados a formas farmacéuticas convencionales, tales como tabletas, comprimidos y capsulas, esto ha sido un gran avance para la farmacoterapéutica de los pacientes, evitando algunos efectos adversos o generando una mejora en la biodisponibilidad de los medicamentos, entre otros sistemas que permiten sensibilidad a la concentraciones del medio liberando de esta manera su contenido ^{4,5}.

Una vía para obtener sistemas de liberación controlada de fármacos es la nanomedicina, esta área brinda una oportunidad enorme al llevar las interacciones del sistema de entrega a escalas nanométricas, así se pueden desarrollar estructuras donde se aprovechan las características de los distintos polímeros utilizados. De este modo se ha llegado el desarrollo de nanopartículas inteligentes las cuales pueden presentar sensibilidad a distintos estímulos como son el pH, la temperatura o condiciones que pueden presentarse en distintas patologías ⁶.

En afecciones como el cáncer, la inflamación y distintos procesos patológicos se ven alteradas estas condiciones generando el efecto EPR o de mejoramiento de la permeabilidad y retención, este efecto que se ha descrito en los últimos años que al darse condiciones donde hay concentraciones altas de bradicinina, el cual aumenta la

permeabilidad vascular, se crean depósitos de fármacos en estas zonas, lo cual presenta una ventaja para los mecanismos de liberación con objetivos más claros para la terapéutica con nanotecnología ⁷.

Las nanopartículas poliméricas son uno de los sistemas de liberación controlada de fármacos que se encuentran dentro de la escala nanométrica, estos sistemas presentan versatilidad debido a los componentes que se utilizan para su síntesis, las modificaciones de tamaño, cargas eléctricas, sensibilidad a pH y temperatura son propiedades de especial importancia para la innovación en la terapéutica actual de padecimientos que van en aumento ^{7,8}.

Esta investigación tiene la finalidad de sintetizar y caracterizar un nanoacarreador polimérico con posibles aplicaciones en la administración de fármacos de manera controlada además de la administración de terapia genética para el tratamiento de patologías inflamatorias como artritis y cáncer.

II.1 Antecedentes

Se han reportado distintas metodologías aplicadas al desarrollo de nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos, dependiendo del tipo de terapia que se pretenda desarrollar se pueden adaptar las técnicas para aprovechar las ventajas de cada una frente al tamaño, estabilidad, biocompatibilidad y sensibilidad ⁹, entre las que destacan la síntesis por ultrasonido, microondas, ablación laser, condensación por gases inertes, co-precipitación, polimerización en emulsión, entre otras ¹⁰.

Desde hace algunos años se han reportado los usos de NIPAAm con distintas aminas para cambiar sus características de sensibilidad a la temperatura y además darle sensibilidad al pH. Por ejemplo, Serrano-Medina et al., reportaron la síntesis de nano/microgeles con características de núcleo-coraza sensibles a la temperatura y al pH utilizando N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (2MBA). Para evitar el uso de detergente se aplicó PEGMA como estabilizador, obteniendo partículas monodispersas de diámetros hidrodinámicos promedio de 40-880 nm. Considerando el entrecruzante utilizado, se obtuvieron mayores tamaños con EGDMA comparado con DVA. Este método presenta la ventaja de ser más rápido y escalable que con la aplicación de surfactante debido a los problemas para la eliminación de este último; se estudió la influencia del PEGMA observándose la marcada influencia que tiene sobre el tamaño y densidad de los geles sintetizados ¹¹.

Por otra parte, Tarabukina et al., exploraron NIPAAm copolimerizado con 4-vinilpiridina en sistemas de doble sensibilidad, donde los polímeros presentan sensibilidad a la temperatura gracias a NIPAAm y al pH por parte de 4-vinilpiridina, estos

eran polímeros lineales en soluciones acuosas donde se buscaba caracterizar la sensibilidad a la temperatura en medios ácidos, simulando procesos de endocitosis. Se encontró que en condiciones de acidez alta, el rango de temperatura de transición se acercaba más a las temperaturas corporales que con NIPAAm, siendo la polimerización con este monómero eficaz para el aumento de la Ttr, gracias al carácter catiónico de la 4-vinilpiridina se abre una ventana para la liberación de fármacos de carácter aniónico¹².

El método de polimerización en emulsión sin detergente se ha realizado antes utilizando como comonómeros a VI y 4-VP con NIPAAm como monómero principal, Zhou et al., realizaron la síntesis de microgeles iónicos termosensibles por esta vía y además se realizó el entrecruzamiento por cuaternarización in situ, siendo esto logrado con la adición de compuestos halogenados como 1,4-dibromobutano o 1,6 dibromohexano. Se obtuvieron microgeles de forma esférica y con tamaños variables dependiendo del grado de cuaternarización; estos microgeles demostraron capacidad de encapsular y liberar tintes aniónicos siendo un modelo aplicable a fármacos del mismo carácter¹³.

Dentro de la bibliografía se reporta el uso de 1-vinilimidazol junto con NIPAAm como un sistema de liberación de la fracción β del factor de crecimiento transformante utilizado para promover la condrogénesis en conejos, obteniendo resultados favorables en la proliferación de los condrocitos¹⁴, una de las propuestas más recientes presenta a polímeros de 1-vinilimidazol como un potencial medio de transporte de ARNip para el uso de terapia genética^{15,16}.

II.2 Justificación

En la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, en el laboratorio de Biofarmacia, actualmente se realizan trabajos de investigación de síntesis de monómeros para el desarrollo de vehículos farmacéuticos inteligentes, utilizando polímeros sensibles a la temperatura y al pH con la finalidad de crear sistemas de liberación controlada con aplicaciones biomédicas.

En la actualidad, los tratamientos de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, el cáncer, entre otras, presentan problemas de toxicidad y efectos adversos debido a la baja especificidad que poseen, lo cual resulta en complicaciones terapéuticas importantes para los pacientes, por tanto, el desarrollo de sistemas de liberación inteligentes que respondan selectivamente a estímulos del medio como son las alteraciones del pH y temperatura inducidas por la inflamación son una posible solución a la problemática.

El desarrollo de nanopartículas poliméricas que sean sensibles al pH y a la temperatura son una alternativa viable que busca aprovechar las ventajas de los monómeros contenidos y sus características eléctricas para realizar el cargado y liberación de distintas sustancias como puede ser desde materiales biológicos, sean secuencias de ADN, ARNip, proteínas, entre otros, o moléculas conocidas con anterioridad como pueden ser antiinflamatorios, citostáticos, entre otros.

Debido a la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, se llevó la atención a las comorbilidades que podían agravar las condiciones de los pacientes infectados y por ello se le dio una gran importancia al desarrollo de nuevas tecnologías farmacéuticas, con

esto la nanomedicina y la terapia genética obtuvieron una oportunidad de crecimiento realmente importante ^{9,17}.

II.3 Objetivos

II.3.1 Objetivo general

Sintetizar nanogeles de P-NIPAAm-co-P-vinilimidazol y de P-NIPAAm-co-P-(4-vinilpiridina) mediante polimerización en emulsión sin detergente, sensibles a la temperatura y al pH.

II.3.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar nanogeles de NIPAAm y vinilimidazol, entrecruzados con EGDMA mediante polimerización en emulsión sin detergente.
2. Sintetizar nanogeles de NIPAAm y 4-vinilpiridina, entrecruzados con EGDMA y mediante polimerización en emulsión sin detergente.
3. Sintetizar nanogeles de NIPAAm, vinilimidazol y 4-vinilpiridina, entrecruzados con EGDMA mediante polimerización en emulsión sin detergente.
4. Caracterizar los nanogeles sintetizados mediante dispersión de luz dinámica (DLS), FTIR, FESEM y potencial zeta.
5. Evaluar la respuesta de los nanogeles sintetizados al pH y a la temperatura, así como su comportamiento con variaciones en ambas condiciones.

CAPITULO III TEORÍA GENERAL

III.1 Sistemas de liberación de modificada

Dentro de la farmacoterapéutica existen distintas formas farmacéuticas que permiten optimizar los tratamientos y aumentar la eficiencia de la liberación de fármacos para obtener perfiles de concentraciones plasmáticas según sea necesario para el paciente, es así que se han desarrollado diversos sistemas que permiten la modulación en cuanto a la entrega de un fármaco ¹⁸.

III.1.1 Sistemas de liberación controlada

Los sistemas de liberación controlada son definidos como tecnologías modificadas que permiten una entrega regulada de agentes terapéuticos, los cuales pueden ser fármacos convencionales o novedosos entre los que destacan los biotecnológicos ^{19,20}. Entre las ventajas que presentan los sistemas de liberación controlada frente a los métodos de administración de fármacos convencionales esta la capacidad de superar barreras como la toxicidad por baja especificidad, biodisponibilidad, solubilidad, entre otros problemas farmacocinéticos y farmacodinámicos ⁵.

Entre los distintos sistemas de liberación modificada destacan dos características a controlar, la capacidad de liberación del fármaco respecto al volumen de carga dando lugar a variaciones en las concentraciones (Fig. 1), estos sistemas logran evitar problemas de múltiples dosificaciones, fármacos con estrecho margen terapéutico donde se logra evitar fluctuaciones no deseadas en la concentración plasmática, entre otros ^{18,21}.

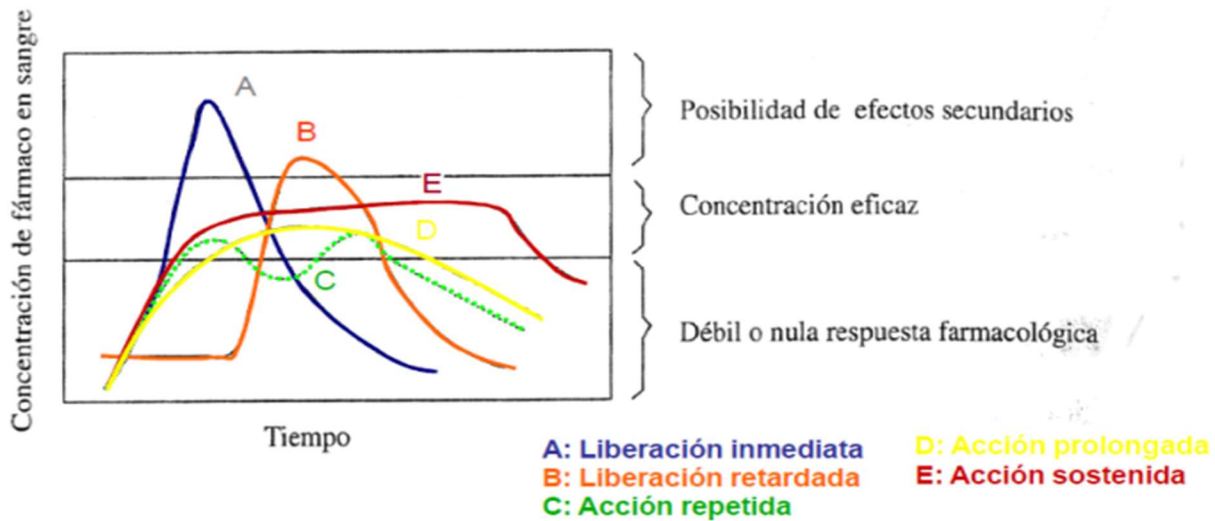


Figura 1. Sistemas de liberación controlada en función de su liberación (adaptado de Ramírez, et al.) ²¹.

III.1.2 Sistemas de liberación dirigida

Dentro de los sistemas de liberación modificada se puede buscar el control en la dirección de entrega del fármaco donde se busca llevar el fármaco a zonas específicas para obtener concentraciones más altas en esas zonas, dando una mayor especificidad a la terapéutica y, por ende, llevar a menores efectos adversos, de igual manera, el aumento en la eficiencia de la administración. Esto se logra al aprovechar condiciones específicas que son generadas por la patología a tratar, dentro de estas destacan marcadores presentes en las células a tratar, alteraciones del medio como pueden ser variaciones de pH, temperatura, gradientes de concentración, entre otras ¹⁸.

III.1.2.1 Direccionamiento pasivo

En ciertas patologías se producen condiciones de inflamación, hipoxia y metabolismo aumentado dentro de las zonas afectadas, por ejemplo, en cáncer, artritis

reumatoide, entre otras. Esto crea una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos adyacentes. El aumento de permeabilidad causa fugas lo que es conocido como efecto EPR, logrando así la penetración de macromoléculas y nanosistemas.

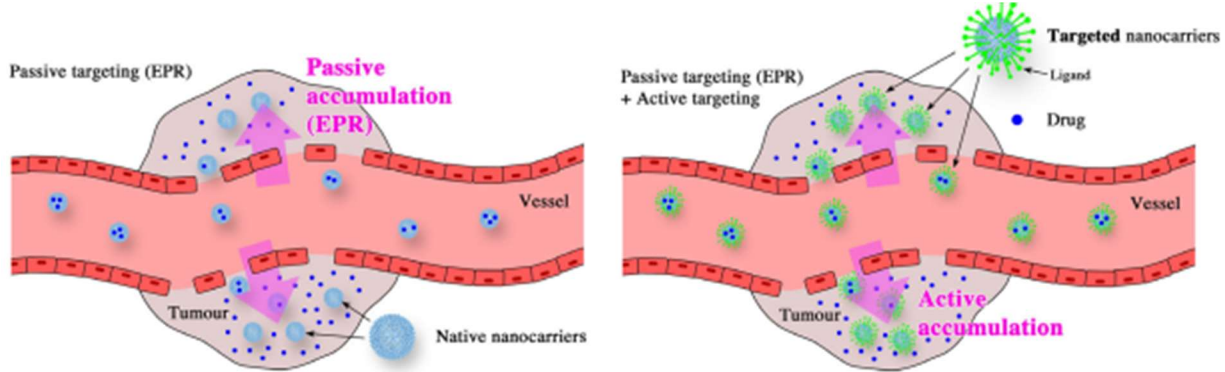


Figura 2. Representación esquemática del direccionamiento activo y pasivo de nanoestructuras (adaptado de Anton, et al.)²².

En el caso del cáncer, esto se puede aprovechar ya que gracias a la ausencia de drenaje linfático en el tumor se da un aumento en la retención, generando una mayor selectividad para la liberación del fármaco dependiente de las características de tamaño, vascularización y fugas del tumor^{1,22}.

Existen distintas moléculas que aumentan el efecto EPR como la bradicinina, el óxido nítrico, prostaglandinas, el factor de permeabilidad vascular (VPF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), entre otras, al ampliarse las fugas de la vascularización gracias a las sustancias pro inflamatorias lleva a una mejora en la captación y retención de nanoestructuras^{2,22}.

III.1.2.2 Direccionamiento activo

El direccionamiento activo de los sistemas de liberación permite aumentar significativamente la carga de fármaco que es entregado a la célula blanco comparado

con el direccionamiento pasivo o en una administración convencional. Esto se realiza por la detección de marcadores específicos de alguna patología como pueden ser distintos tipos de cáncer, es así que se puede dirigir la terapia al conjugarse con anticuerpos, así como péptidos, ácidos nucleicos y aptámeros ²³.

Con modificaciones a la superficie de las nanopartículas se pueden utilizar distintas etiquetas, no solamente para dirigir activamente hacia la célula si no para promover la internalización del sistema y de esta manera dirigir a sitios intracelulares específicos según lo requiera el fármaco, logrando generar sinergia según sea la estrategia de dirección ^{24,25}.



Figura 3. Funcionalización de superficie para la dirección activa (adaptado de Smerkova, et al.) ²⁵.

III.2 Polímeros

Se definen a los polímeros como cualquier sustancia, natural o sintética, que está compuesta por moléculas muy largas, llamadas macromoléculas compuestas de múltiples unidades químicas llamadas monómeros. Existen distintos polímeros en los organismos vivos, por ejemplo, las proteínas, celulosa y ácidos nucleicos, a su vez,

existen polímeros minerales como el diamante, cuarzo, polímeros orgánicos como el policloruro de vinilo, entre otros ²⁶.

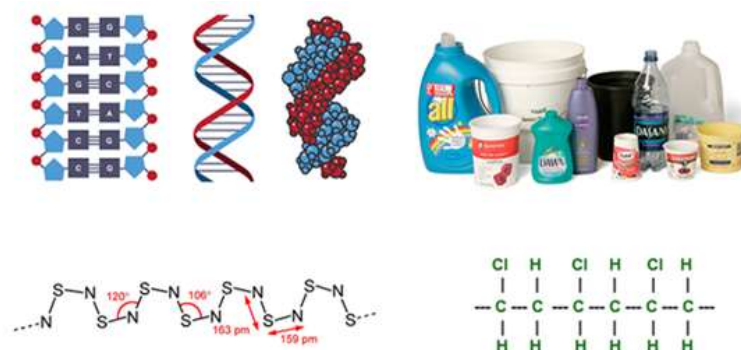


Figura 4. Distintos tipos de polímeros.

III.2.1 Monómeros

Los monómeros son las unidades estructurales básicas de un polímero, es decir, los componentes en los cuales se pueden dividir las macromoléculas, por ejemplo, los nucleótidos son los monómeros del ADN, los aminoácidos son los monómeros de las proteínas, el etileno del polietileno, entre otros ²⁷.

III.2.2 Polimerización

Se define como polimerización al enlace de unidades estructurales mediante reacciones químicas, lo que lleva a la formación de macromoléculas de gran tamaño que pueden variar en la estructura de sus enlaces, además, los mecanismos mediante los cuales se generan estos macrómeros también poseen variaciones, siendo dos tipos de polimerización a grandes rasgos, polimerización por adición y polimerización por condensación ²⁸.

La polimerización por reacción en cadena o adición, posee 3 etapas, la iniciación de la cadena, propagación y terminación, mientras que la reacción por condensación es

más bien un proceso escalonado en el cual se liberan moléculas de agua en el proceso, causando así la unión covalente de los monómeros ^{27,28}.

III.2.2.1 Estructura polimérica

Los macrómeros obtenidos mediante una polimerización pueden ser de distintas características dependiendo del grado y densidad de entrecruzamiento que puede ser propiciado por un agente químico o por punto de conexión dentro del polímero, esto lleva a la formación de puntos de ramificación y de igual manera, a puntos de unión o convergencia. A grandes rasgos se pueden clasificar en tres grupos como se presenta en la Figura 5, existen polímeros lineales que poseen un inicio y final único, cíclicos donde no presentan un inicio ni final, si no que su cadena está cerrada y las estructuras ramificadas que pueden ser de único punto o de puntos múltiples, si se entrecruzan entre polímeros de múltiples ramificaciones creando redes poliméricas ^{28,29}.

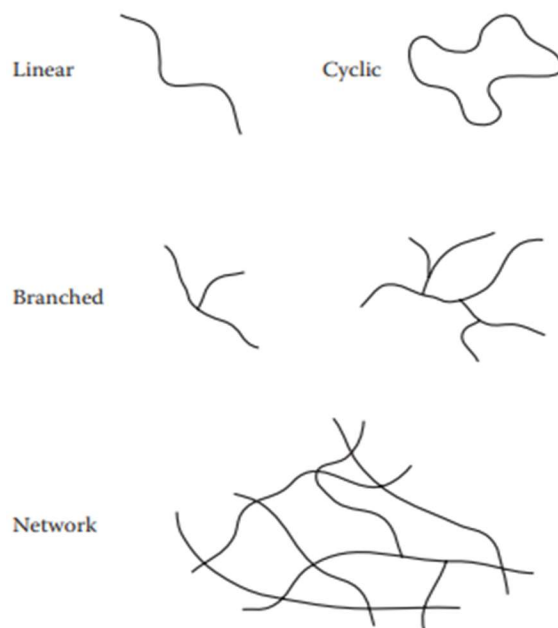


Figura 5. Representación de las estructuras poliméricas.

III.2.2.2 Homopolímeros y copolímeros

Dependiendo del tipo de monómeros que posean los polímeros se pueden clasificar dentro de homopolímeros, en caso de que las unidades monoméricas sean idénticas entre sí y su nomenclatura será con el prefijo poli seguido del monómero, en caso de que los monómeros presentes en la cadena sean distintos se clasifican a estos como copolímeros, existen distintas maneras en las cuales se pueden entrelazar y ordenar estos monómeros ³⁰.

III.2.2.2.1 Tipos de copolímeros

Dentro de los tipos de copolímeros que se pueden generar destacan dependiendo de su ordenamiento de cadena lineal y a su vez, su ordenamiento dependiente de ramificaciones los cuales pueden ser conjuntos de los mismos. Dentro de las variaciones de la cadena lineal existen los copolímeros estadísticos, en los cuales las unidades de repetición se manejan por reglas estadísticas que involucran las proporciones en las que fueron polimerizados, los polímeros alternantes son cadenas lineales en las que un monómero va seguido de su comonómero y presentan una secuencia repetitiva A-B-A-B.

Por otro lado, se presentan los polímeros en bloque, en este caso son cadenas lineales que sus unidades de repetición son secuencias largas de monómeros con un sistema repetitivo, los más comunes AB en bloque y ABA en bloque. Los polímeros ramificados también pueden presentarse como ramificaciones en bloque, donde una cadena seguida de A esta ramificada por cadenas de B o presentar estructuras alternantes similares a los patrones lineales ^{28,29}.

Tabla 1. Tipos de copolímeros y su estructura.

Tipos de copolímeros	Estructura
Estadísticos	$\sim B-B-B-A-B-B-A-B-A-A \sim$
Alternantes	$\sim A-B-A-B-A-B-A-B-A-B \sim$
En bloque	$A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-B-B-B-B$ $A-A-A-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-B-B-A-A-A-A-A-A-A-A$
Ramificados	$B-B-B-B-B-B$ $ $ B $ $ $A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A$ $ $ B $ $ $B-B-B-B-B-B-B-B$

III.2.3 Polímeros inteligentes

Los polímeros inteligentes son comprendidos como polímeros y copolímeros que contienen redes de entrecruzamiento, su característica es la habilidad de responder a cambios físicos o químicos por estímulos externos, entre los cambios en el medio que detonan la respuesta destacan las variaciones de temperatura, pH, ultrasonido y fuerza iónica, no obstante, estos no son los únicos, el potencial redox, la radiación electromagnética y cambios por agentes químicos o bioquímicos pueden ser también estimulantes. Los estímulos físicos modulan el nivel energético de los polímeros, mientras que los estímulos químicos inducen respuestas al alterar las interacciones moleculares ³¹.

III.2.3.1 Polímeros sensibles a la temperatura

La temperatura ha sido un estímulo bastante estudiado y su respuesta en sistemas poliméricos ha dado alternativas en la modulación y aplicación de sistemas de liberación controlada. Para aplicaciones biofarmacéuticas es importante buscar polímeros que presenten temperatura crítica cercana a la temperatura corporal o que puedan modificarse con la inclusión de grupos hidrofóbicos y/o hidrófilos, esto se usa para generar cambios en el volumen de los polímeros, lo que permite la liberación de cargas de fármacos en zonas con actividad metabólica aumentada. El uso de distintos monómeros como la NIPAAm han sido ampliamente estudiado debido a su versatilidad en el desarrollo de sistemas de liberación ^{32,33}.

III.2.3.1.1 N-isopropilacrilamida

La N-isopropilacrilamida o NIPAAm es un sólido cristalino soluble en agua que funciona como un monómero clave en el desarrollo de polímeros termorresponsivos, al polimerizarse presenta características interesantes como son una temperatura crítica de transición de 32 °C ³⁴, debajo de esta temperatura el P-NIPAAm funciona de manera hidrofílica lo que permite la expansión del polímero, mientras que al aumentar la temperatura por encima del punto crítico las cadenas poliméricas colapsan y toman una conformación de glóbulo hidrofóbico, causando un descenso en el tamaño ³⁵.

La temperatura de transición de estos polímeros puede modularse al copolimerizar con otros monómeros, logrando generar una aproximación a la temperatura corporal para aplicaciones biomédicas, de igual manera, al usar comonómeros ionizables se pueden generar sistemas de respuesta dual a la temperatura y al pH lo que aprovecha las

condiciones causadas por la inflamación o el metabolismo aumentado para la dirección en la entrega del fármaco ³⁶.

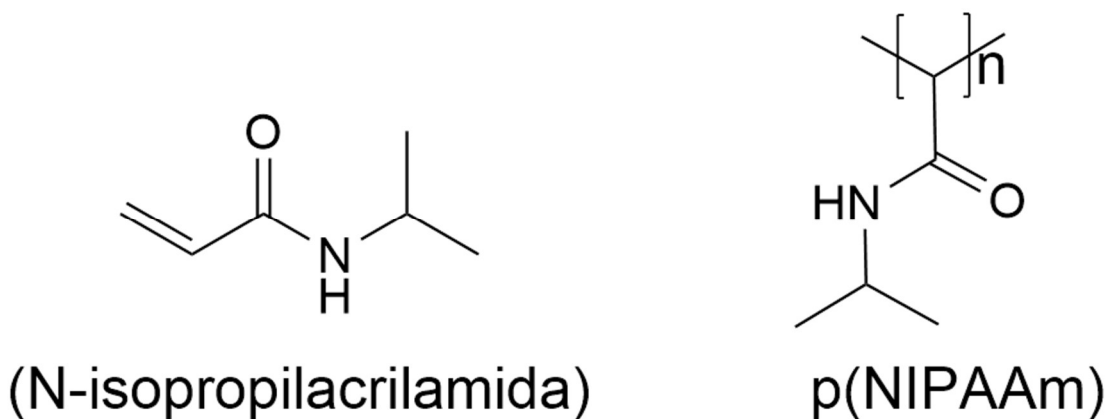


Figura 6. Representación esquemática de NIPAAm y p(NIPAAm).

III.2.3.2 Polímeros sensibles al pH

Debido a que las múltiples variaciones en el pH a través del cuerpo este estímulo presenta una ventaja importante en el desarrollo de sistemas de liberación responsivos al mismo, los valores en orgánulos celulares y en vesículas de distintos orígenes poseen pH a los que ácidos y bases débiles pueden presentar cambios en su ionización y por ende, sufrir una transición de fases aumentando o disminuyendo su volumen según sea el carácter del monómero ³⁷.

Se ha estudiado ampliamente el microambiente que se desarrolla en situaciones de hipoxia e inflamación, donde se generan condiciones de acidez cercanas a un pH 6.5, (Figura 7), por ello, el desarrollo de sistemas que rondan estos valores son ampliamente utilizados, entre estos destacan monómeros que poseen aminas y ácidos carboxílicos libres permitiendo la ionización de los mismos. La introducción de terapias novedosas en estos sistemas como son la funcionalización con ARNip, anticuerpos monoclonales,

CRISPR-Cas9, entre otros, estos han centrado la mira en las condiciones de pH características de distintas estructuras intracelulares ^{3,25}.

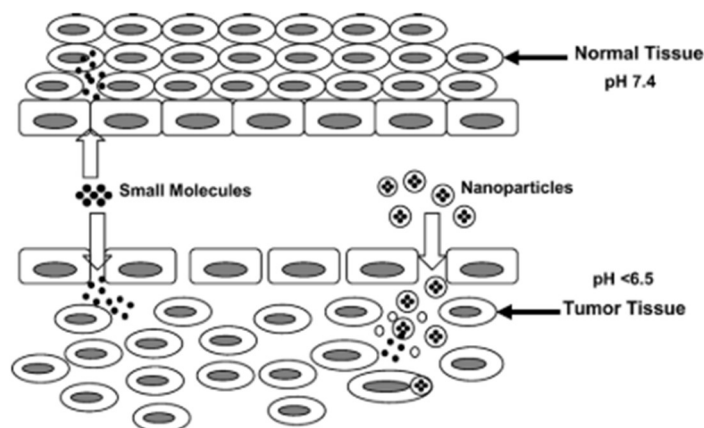


Figura 7. Diferencia de pH en tejido sano y tumoral (inflamación) (adaptado de Ganta, et al. ³⁷.

III.2.3.2.1 1-Vinilimidazol

El 1-vinilimidazol es un monómero básico soluble en agua que es capaz de formar homopolímeros cuaternizables y a su vez formar copolímeros funcionales entre los que destacan la conjugación con monómeros que presenten sensibilidad a la temperatura ³⁸. Uno de los métodos más comúnmente utilizados para la obtención de poli(1-vinilimidazol) es por polimerización de radicales libres y su posterior cuaternización para conjugarse con sustancias de carácter ácido, en los estudios recientes se ha demostrado su potencial como un sistema de liberación de terapia génica ¹⁵.

Debido a los grupos ionizables presentes en este monómero se ha visto involucrado en el desarrollo de sistemas de liberación sensibles al pH, al presentar transiciones de volumen en condiciones ácidas provee de sensibilidad para la entrega de fármacos

dirigida a orgánulos o microambientes inflamatorios donde las condiciones propician la acidez ^{3,15}.

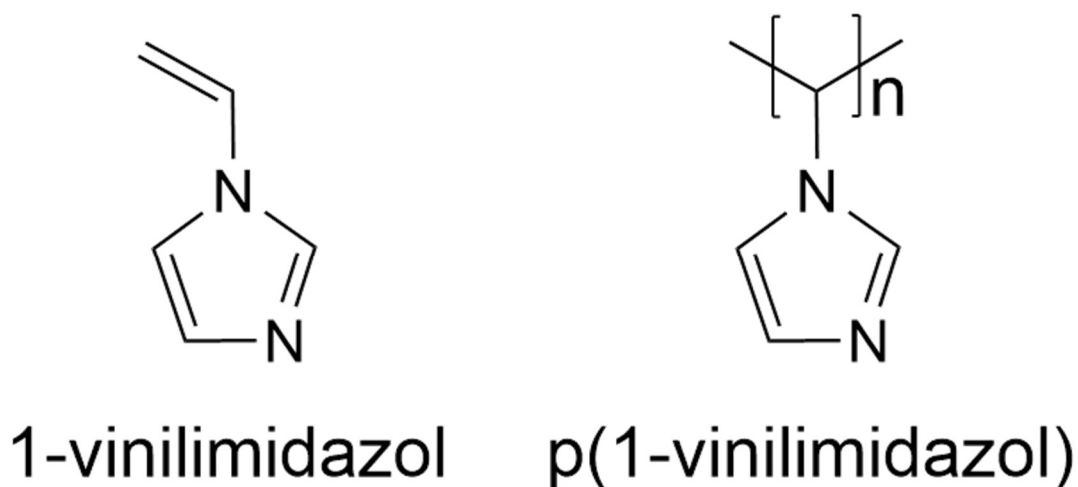


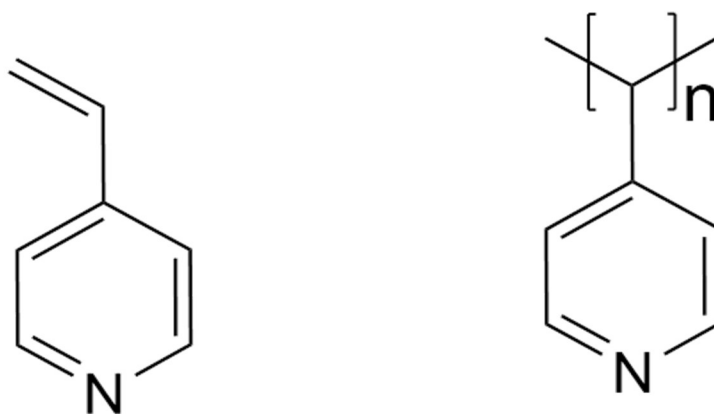
Figura 8. Representación esquemática de 1-vinilimidazol y p(1-vinilimidazol).

III.2.3.2.1 4-Vinilpiridina

La 4-vinilpiridina es un monómero básico, similar a 1-vinilimidazol que tiene la capacidad de homopolimerizar y exhibir grupos amina ionizables, a su vez, esos mismos grupos se pueden funcionalizar o extender con cadenas carbonadas para darle propiedades hidrofóbicas o hidrófilas según sea la aplicación ³⁹. Por medio de precipitación por radicales libres se puede obtener el poli(4-vinilpiridina) ya sea en homopolímero o copolímero en caso de generar formulaciones con otros monómeros donde se buscan aprovechar su capacidad de ionización para brindar a polímeros sensibilidad al pH, esta característica se ha buscado introducir en aplicaciones biofarmacéuticas desde hace algunos años ⁴⁰.

La polimerización con monómeros sensibles a la temperatura ha sido anteriormente reportado buscando generar sistemas de liberación sensibles al pH y la temperatura al

modificar las temperaturas de transición de otros polímeros con relación al grado de entrecruzamiento a su vez, se han descrito las propiedades termorresponsivas dependientes de cuaternarización y su capacidad de vincularse con sustancias acidas como ARN, ADN y anticuerpos ^{15,41}.



4-vinilpiridina p(4-vinilpiridina)

Figura 8. Representación esquemática de 4-vinilpiridina y p(4-vinilpiridina)

III.3 Nanotecnología

La nanotecnología se define como el entendimiento y control de la materia a nanoescala en dimensiones de 1 a 100 nm donde se tienen fenómenos únicos debido a que a ese nivel pueden exhibir propiedades físicas, químicas y biológicas que presentan diferencias importantes que a granel ⁴².

Se comprende dentro de esta rama a la nanofabricación, los nanomateriales y el aplicar modelos químicos y físicos a la escala nanométrica, dentro de esta se pueden encontrar desde moléculas como la glucosa, oligonucleótidos, hasta proteínas, anticuerpos y virus (Figura 9). Existen nanoestructuras que se encuentran dentro de esta

escala como son los dendrímeros, liposomas y nanopartículas de distintas características (metálicas, poliméricas, etc.)²⁰.

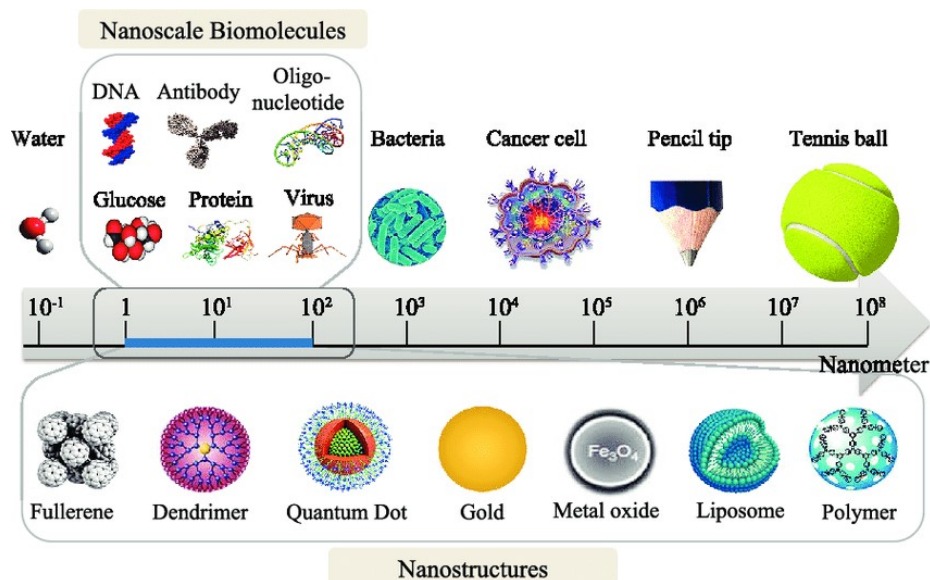


Figura 9. Nanoescala y nanoestructuras aplicables (adaptado de Saallah, et al.)²⁰.

III.3.1 Nanomedicina

Se entiende por nanomedicina a la utilización de sistemas nanométricos como las nanopartículas, esto constituye una herramienta para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, en esta rama de la medicina se utilizan nanopartículas modificadas que permiten identificar a la enfermedad por marcadores o condiciones específicas que mejoran la entrega en el sitio adecuado de fármacos y la correcta liberación de los mismos. Distintas características de las nanopartículas pueden ser modificadas como la forma y tamaño a su vez, las propiedades fisicoquímicas pueden manejarse según sea necesario^{17,43}.

Debido a la versatilidad que presentan las nanopartículas para el tratamiento y diagnóstico de patologías, la alta especificidad que se puede obtener mediante la

modificación de las mismas ha llevado a esta rama medica como una de las tendencias para el desarrollo de medicamentos novedosos que presenten sistemas de liberación con características de biodisponibilidad, especificidad y toxicidad mejoradas ^{6,17,43}.

III.3.2 Nanopartículas como sistemas de liberación

Las nanopartículas como un sistema de liberación de fármacos son sistemas coloidales de una gran relación superficie volumen gracias al pequeño tamaño que poseen, estos sistemas poseen fundamentalmente dos partes, las nanopartículas y el fármaco que van a transportar, estos se pueden unir covalentemente o estar encapsulados dentro de la nanopartícula para protegerlo y liberarlo en las condiciones adecuadas ⁴⁴.

La eficiencia de estos sistemas radica en la capacidad de minimizar los efectos adversos y aumentar la eficacia de los tratamientos al liberar de manera dirigida una carga de fármaco, al aprovechar condiciones como el EPR se puede crear una acumulación en sitios de inflamación lo que propicia mayores concentraciones en la zona, vinculándolo con mecanismos de dirección activa se propicia una mayor interacción entre los sistemas nanopartículas y la zona afectada ^{1,3,17}.

Debido a la versatilidad que presentan para el cargado de distintos fármacos, sean convencionales o biotecnológicos se ha buscado utilizar estas nanoestructuras en terapias tanto diagnosticas como de liberación de fármacos, a pesar de que se ha mantenido un enfoque predominante en el área de antitumorales una alternativa que ha tomado relevancia es la liberación de antiinflamatorios, antihipertensivos y hormonas ^{18,45}.

CAPITULO IV PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 Equipos y reactivos

IV.1.1 Equipos

- i. Balanza analítica Denver Instrument M-200
- ii. Detector de luz dinámica (DLS) Equipo ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments, ZEN3500 con láser verde 532nm
- iii. Liofilizador LABCONCO Freezone
- iv. Parrilla con agitador magnético
- v. Potenciómetro Corning Scholar 3000
- vi. ATR Thermo Scientific modelo Nicolet iS5 FT-IR

IV.1.2 Reactivos

- i. 1-Vinilimidazol (1-VI)
- ii. 4-Vinilpiridina (4-VP)
- iii. Agua desionizada
- iv. Agua miliQ
- v. Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA)
- vi. Poli(etilenglicol) metil éter metacrilato (PEGMA)
- vii. *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) (TCI)
- viii. Nitrógeno de alta pureza (INFRA S.A. de C.V.)
- ix. Persulfato de amonio (APS)
- x. Removedor de inhibidores

En caso de no mencionar la marca del reactivo estos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

IV.2 Purificación de *N*-isopropilacrilamida

Debido a que el monómero NIPAAm en su presentación comercial contiene inhibidores de polimerización se debe de realizar una purificación para eliminarlos, así como impurezas que pudiera contener. El monómero se purificó con hexano (25 g NIPAAm / 200 mL de hexano). En un matraz Erlenmeyer se colocó el hexano y se calentó en baño de agua a 45°C con agitación constante junto con la NIPAAm, se agitó hasta homogeneizar la solución y posterior a ello se filtró en caliente y dejó enfriar.

Una vez enfriado se puede observar la cristalización y este contenido se filtró en vacío y se lavó con hexano frío (cuantas veces sea necesaria para obtener un color blanco puro). La NIPAAm purificada se dejó secar a temperatura ambiente durante 48 horas protegiéndola de contaminaciones externas.

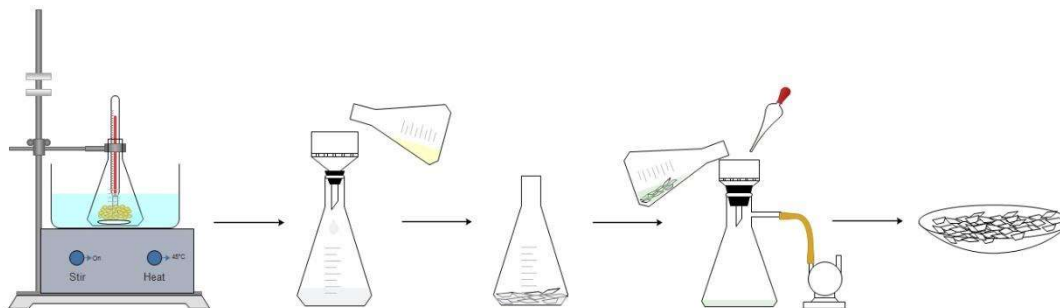


Figura 10. Purificación de NIPAAm.

IV.3 Remoción de inhibidores

Para la remoción de inhibidores se puso una delgada capa de algodón en una pipeta Pasteur de vidrio y posterior a ello una capa de 6 cm de removedor de inhibidor marca Sigma-Aldrich, cada una de las pipetas se utiliza para reactivos distintos, se añade mililitro por mililitro cada reactivo y se deposita en viales de 5 ml cubiertos de la luz para evitar la polimerización.

IV.4 Síntesis de nanopartículas

Se preparó un soporte universal con agitador magnético y pinzas para sostener un matraz bola de 100 mL, se colocaron 50 mL de agua MiliQ, y bajo agitación constante se agregó NIPAAm en diferentes proporciones hasta que se disolvió, posterior a ello se agregó el comonomero según sea el caso (1-VI o 4-VP). Cuando se observó la uniformidad se agregó PEGMA y EGDMA en las proporciones correspondientes, después se colocó un tapón de goma y sello con parafilm para evitar fugas, se desgasificó mediante inyección de N_2 durante 30 minutos para hacer la atmosfera inerte. Se utilizó una cánula conectada al nitrógeno que llegue al fondo del matraz y otra cánula que permite la salida de aire en la parte superior del matraz.

En paralelo, se preparó otro soporte universal junto con una parrilla y agitador magnético para preparar un baño de aceite a una temperatura de $85^{\circ}C \pm 5^{\circ}C$ monitoreando la temperatura con un termómetro para evitar variaciones de la temperatura. Después del proceso de desgasificación se ambiente el matraz en agitación constante durante 30 minutos dentro del baño de aceite, pasado el tiempo se agregó el iniciador (APS) por medio de una jeringa para evitar la pérdida de la atmosfera inerte. Se mantuvo la reacción durante 45 minutos y se observaron cambios en la coloración desde un color blanco hasta colores azulados. Terminado el tiempo se colocó la reacción en baño de hielo para detener la polimerización de las nanopartículas. Después de reducir la temperatura se colocó en tubo falcón de 50 mL y se tomó una muestra para determinar su tamaño y distribución.

IV.5 Purificación por diálisis.

Se prepararon membranas para diálisis con tamaño de poro de 12-14 kDa en agua destilada para hidratarlas, se pinzaron de un extremo y se vertió la solución de nanopartículas dentro de la membrana, posterior a ello se cerró el otro extremo de la membrana, se colocó en un recipiente con suficiente agua destilada para cubrir las membranas y se cambió cada 12 horas durante 4 días. Se tomó muestra para realizar mediciones de tamaño y distribución para verificar la purificación, después se separó en viales para congelar la muestra y liofilizar. La muestra recolectada se analizó en distintas condiciones para comparar con las características después del proceso de liofilización.

IV.6 Mediciones en ZetaSizer Nano-ZS (DLS)

Las soluciones se prepararon según las condiciones a replicar, en caso de que sean mediciones a distintos pH se toman en una proporción 9:1 de buffer con respecto a las nanopartículas. Según sea la medición se pondrán en las celdas correspondientes, si es medición de tamaño se utilizará una celda desechable de poliestireno de 1cm x 1cm, en caso de ser una medición de potencial zeta se utiliza una celda DTS1070.



Figura 11. Celdas utilizadas para mediciones de tamaño y Potencial Zeta.

Las mediciones de tamaño requieren de 1 mL de muestra y se realizan a 25°C por duplicado. Para evaluar la temperatura se realizaron mediciones en intervalos de 2°C, desde los 20°C hasta los 50°C. El Potencial Zeta ocupa 900 uL y se realizaron las mediciones por duplicado en condiciones de 25°C. Todas las mediciones se realizaron en condiciones sin buffer y bufferizadas a pH 7.4, 6.8, 6.0 y 5.0.



Figura 12. Equipo ZetaSizer Nano-SZ

La temperatura de transición se determinó con el comportamiento del tamaño de partícula con respecto a la temperatura, siendo observado una variación mayor identificable mediante análisis estadístico.

IV.7 Liofilización

El equipo utilizado fue el Liofilizador LABCONCO Freezone, el cual requiere de una muestra completamente congelada por lo que se separa la muestra en viales de peso conocido, se coloca un volumen de 10-15 mL para realizar el cálculo del rendimiento. Se tapan las muestras con parafilm para evitar la contaminación y después de congelar correctamente la muestra se inicia el proceso de liofilizado que lleva 48 horas.

IV.8 Reconstitución del liofilizado

Se preparan la solución a concentración de 1 mg de liofilizado por cada mL de agua destilada y se mantiene en agitación constante durante 12 horas, en caso de ver una disolución incompleta mantener 12 horas más.

IV.9 Caracterización por FT-IR

Se utilizó el equipo ATR Thermo Scientific modelo Nicolet iS5 FT-IR para los análisis de infrarrojo, la limpieza del equipo se realizó con solución de etanol, inicialmente se toman lecturas de blanco y posterior a ello se coloca la muestra de liofilizado de las nanopartículas en el detector del equipo y se ajusta la punta para su uso. Las lecturas se hacen con un barrido de 16 lecturas para cada compuesto a analizar. Se realizó una comparación de los componentes de las formulaciones y el producto final para identificar las bandas características y comprobar la polimerización de las nanopartículas.

IV.10 Caracterización por FESEM

Para realizar el análisis de la estructura de las nanopartículas se preparó una solución de nanopartículas a 0.02% peso/volumen, se colocó una gota sobre una rejilla de cobre cubierta de carbono especializada para su uso en microscopia electrónica de transmisión de campo, se dejó secar las nanopartículas y posterior a ello se colocó una gota de ácido fosfotúngstico al 1%, se retiró el excedente, dejó secar y proceso de acuerdo a protocolos de la microscopia.

CAPITULO V RESULTADOS Y DISCUSION

V.1 Síntesis de nanopartículas de NIPAAm/VI, NIPAAm/VP y NIPAAm/VI/VP

V.1.1 Componentes

Se obtuvieron micropartículas de NIPAAm/VI, NIPAAm/VP y NIPAAm/VI/VP formuladas de acuerdo a la tabla 2, los % se realizaron en relación a los moles totales de NIPAAm y PEGMA, se mantuvieron las relaciones constantes únicamente modificando el comonomero que fuera a ser implementado en la formulación y la proporción en el que este se añadió.

Tabla 2. Proporción de los componentes de cada formulación.

Componentes	NIPAAm/VI	NIPAAm-VP	NIPAAm/VI/VP
NIPAAm/PEGMAm	70:30	70:30	70:30
1-VI	10%	x	5%
4-VP	x	10%	5%

V.1.1 Rendimiento de reacción

Se realizó un análisis de datos para calcular el rendimiento mediante gravimetría. La tabla 3 muestra que el rendimiento promedio de todas las formulaciones supera el 85% y presenta una desviación estándar menor a 5, por lo que se puede catalogar a las reacciones con un buen rendimiento y poca variabilidad, las tres formulaciones presentaron rendimientos de reacción muy similares tomando en cuenta que hay un cambio o adición de comonomero dependiendo de la formulación sintetizada.

Tabla 3. Rendimiento de reacción de las distintas formulaciones.

Formulación	Rendimiento (%)	Desviación estándar
NIPAAm/VI 10%	86.55	3.59
NIPAAm/VP 10%	87.72	3.78
NIPAAm/VI/VP 5%/5%	86.14	4.65

V.1.2 Liofilizado y preparación.

Las nanopartículas obtenidas se observan en la Figura 13, se presenta la suspensión después de dializar y listas para el proceso de liofilizado donde se observa una suspensión con un color azul traslucido (Fig. 13a), lo cual se atribuye a la dispersión de luz causada por las nanopartículas o efecto Tyndall. Después de liofilizar se pueden apreciar las nanopartículas como hebras similares al algodón de color blanco (Fig. 13b), al preparar la suspensión a concentración de 1 mg/mL se observa una disminución en la tonalidad azulada lo que indica una menor concentración (Fig. 13c).



Figura 13. Nanopartículas A) antes de liofilizar, B) liofilizadas y C) resuspendidas.

V.2 Caracterización de nanopartículas de NIPAAm/VI, NIPAAm/VP y NIPAAm/VI/VP

V.2.1 Tamaño de partícula

Las mediciones de tamaño fueron tomadas antes y después del proceso de liofilizado a una temperatura de 25°C, se tomaron los datos por duplicado de distintas reacciones y se muestran los tamaños promedio de diámetro hidrodinámico, su índice de polidispersidad y sus respectivas desviaciones estándar en la tabla 4.

Tabla 4. Tamaño de las formulaciones antes y después de liofilizar.

Formulación	Antes de liofilizar			Después de liofilizar		
	Z-ave (d.nm)	DE	PDI	Z-ave (d.nm)	DE	PDI
NIPAAm/VI	238.60	50.73	0.209	229.13	8.49	0.241
NIPAAm/VP	222.65	34.86	0.172	203.00	51.09	0.274
NIPAAm/VI/VP	252.70	19.25	0.194	249.25	4.45	0.209

Los resultados presentados en la tabla demuestran una distribución homogénea de las nanopartículas debido a su PDI inferior a 0.25, antes de liofilizar con tamaños de partícula de 253 nm hasta 220 nm, después de liofilizar se determinó que no hay variaciones estadísticamente significativas ($p > 0.05$), se reflejó de igual manera un aumento del índice de polidispersidad al llegar hasta 0.275, el tamaño que poseen aun después del proceso de liofilizar y la distribución permite clasificar el proceso como estable ya que no hubieron variaciones estadísticamente significativas, en las Figuras

14, 15 y 16, se muestra gráficamente la distribución de tamaños antes y después de liofilizar donde se puede observar el desplazamiento de las distintas formulaciones.

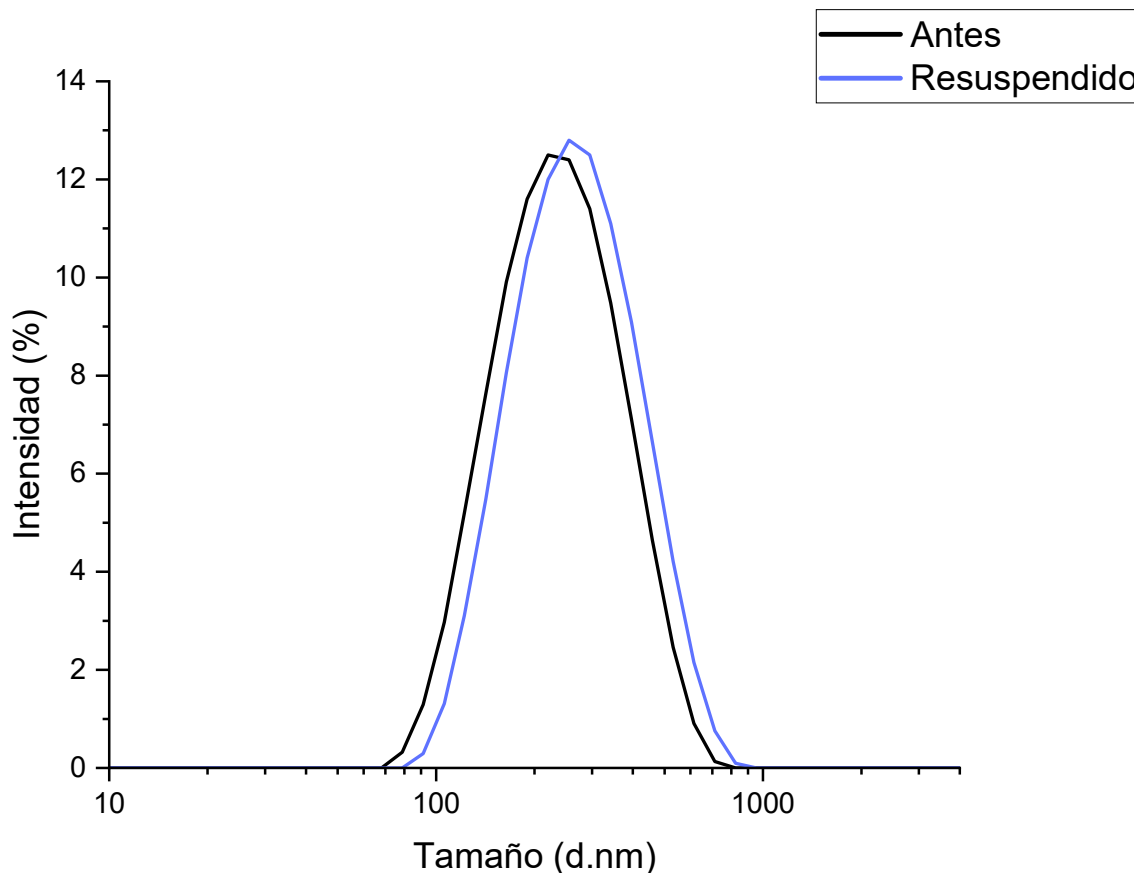


Figura 14. Gráfica de distribución de tamaño de partícula de microgeles de NIPAAm/VI 10% antes y después de liofilizar.

En la Figura 14 de NIPAAm/VI 10% se puede observar visualmente un ligero desplazamiento hacia la derecha de la gráfica de distribución donde se aumenta el índice de polidispersidad desde .21 hasta .24 aunque se observe un menor tamaño de partícula, esto nos permite identificar a la formulación como estable frente al proceso de liofilizado ya que el desplazamiento es muy pequeño. rendimiento y poca variabilidad.

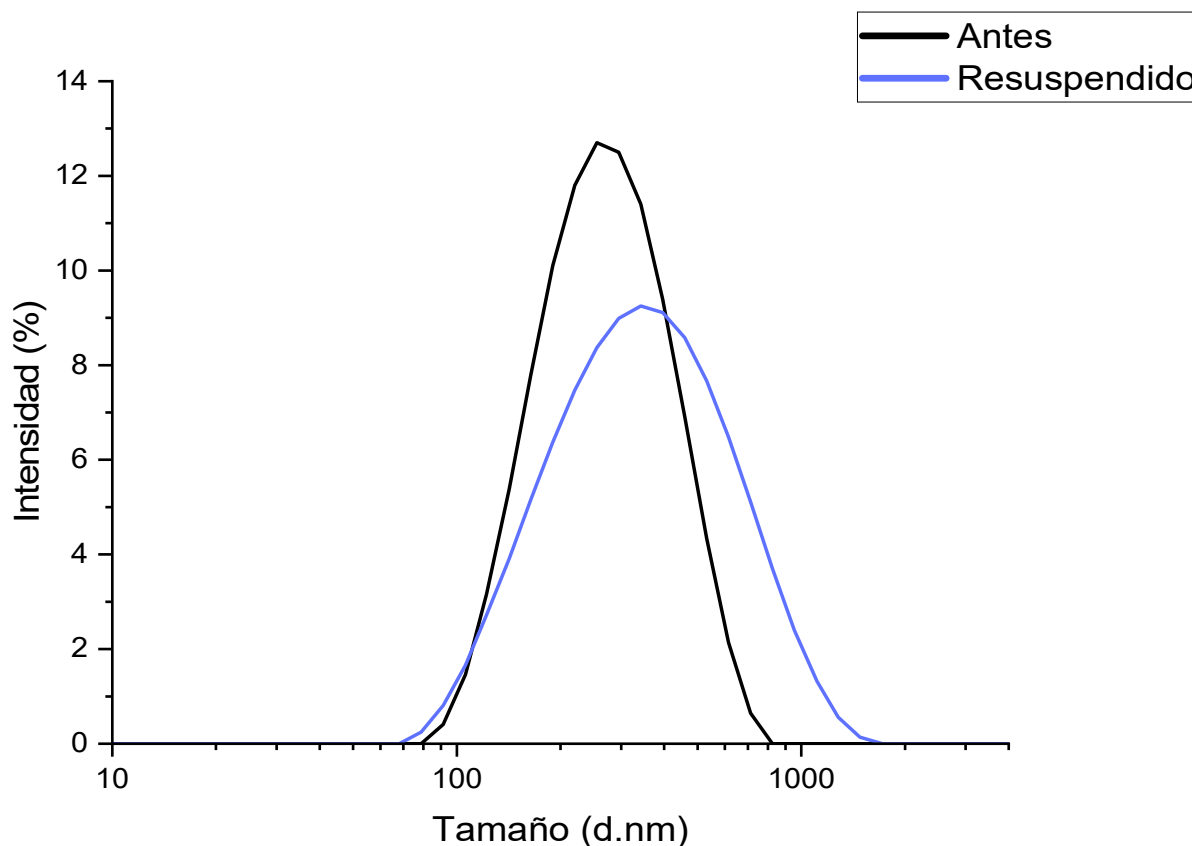


Figura 15. Gráfica de distribución de tamaño de partícula de microgeles de NIPAAm/VP 10% antes y después de liofilizar.

En la Figura 15 de NIPAAm/VP 10% se aprecia el desplazamiento hacia la derecha de la curva de distribución y un aumento pronunciado del índice de polidispersidad que varía desde 0.172 hasta 0.274, a pesar de esta desviación el tamaño de partícula disminuyó alrededor de 20 nm, esta formulación no tuvo problemas para ser reconstituido después del proceso de liofilizado por lo que se mantuvo estable.

Como se observa en la Figura 16, la formulación de NIPAAm/VI/VP 5%/5% presenta un comportamiento semejante a las otras formulaciones al desplazarse ligeramente hacia la derecha y un aumento en el índice de polidispersidad de 0.195 a 0.209, fue la formulación que presentó mayor estabilidad en cuanto a tamaño promedio

de partícula al sufrir cambios muy pequeños en estos valores, no se presentaron problemas para la reconstitución de esta formulación y se mantuvo estable para todas las mediciones.

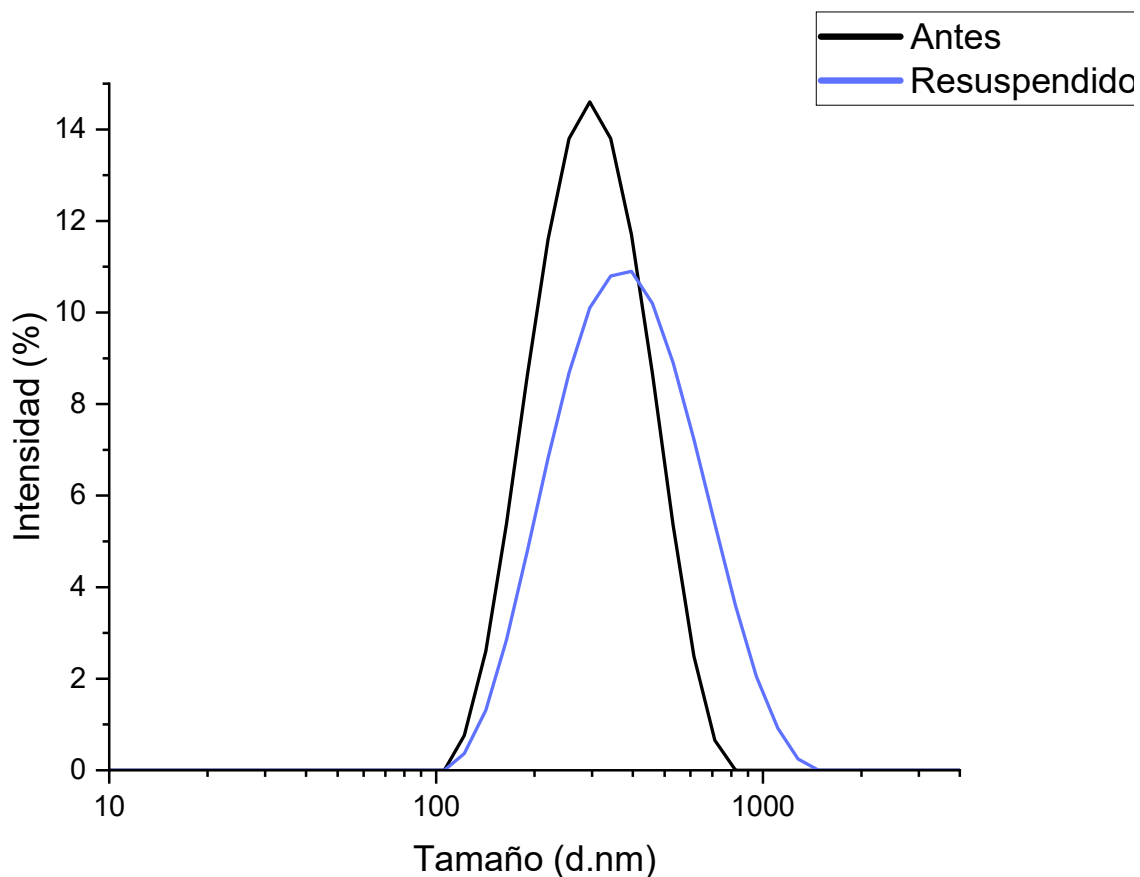


Figura 16. Gráfica de distribución de tamaño de partícula de microgeles de NIPAAm/VI/VP 5%/5% antes y después de liofilizar.

El tamaño y estructura de nanopartícula fue confirmado por FESEM observándose una estructura esférica que concuerda con la finalidad de obtener productos de tipo núcleo-coraza, el tamaño de partícula observado ronda los 130 nm lo cual concuerda con el comportamiento de deshidratación observado al analizar mediante este tipo de técnicas.

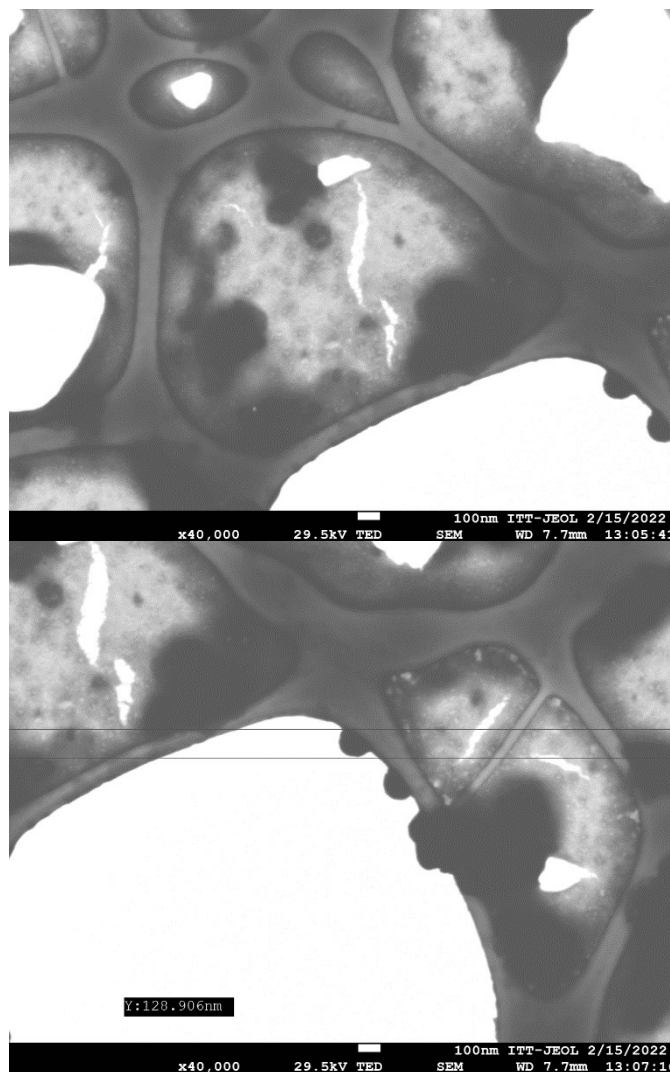


Figura 17. Microscopia mediante técnica FESEM de nanogeles teñidos con ácido fosfotúngstico al 1%.

V.2.2 Análisis por FT-IR

El análisis de infrarrojo se realizó para todas las formulaciones y sus respectivos componentes, debido a que las formulaciones presentan el mismo tipo de enlaces se aprecia una similitud en sus bandas características con pequeños desplazamientos en cuanto a número de onda y de intensidad, en las Figuras 18, 19 y 20, se presentan los infrarrojos de cada una de las formulaciones. Entre las bandas características que permitieron la identificación de las

estructuras presentes en la formulación se encuentra un estiramiento del enlace N-H perteneciente al enlace amida a 3289 cm^{-1} de la NIPAAm, una banda a 3076 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-H de las insaturaciones presentes en los anillos de 1-VI y 4-VP, a los 2970 cm^{-1} y 2875 cm^{-1} encontramos bandas correspondientes al estiramiento C-H de metilos y metilenos respectivamente atribuibles a la cadena principal del polímero y los metilos terminales de la NIPAAm, a 1640 cm^{-1} se aprecia una banda intensa identificable por el estiramiento C=O de la amida presente en NIPAAm y C=N presente en los anillos de 1-VI y 4-VP, a 1543 cm^{-1} se observa el doblamiento del enlace N-H presente en la NIPAAm, a 1456 y 1386 cm^{-1} se observan bandas características del doblamiento C-H de metilos y metilenos. A 1106 cm^{-1} existe un pico intenso que se presenta por los éteres encontrados en PEGMA y EGDMA.

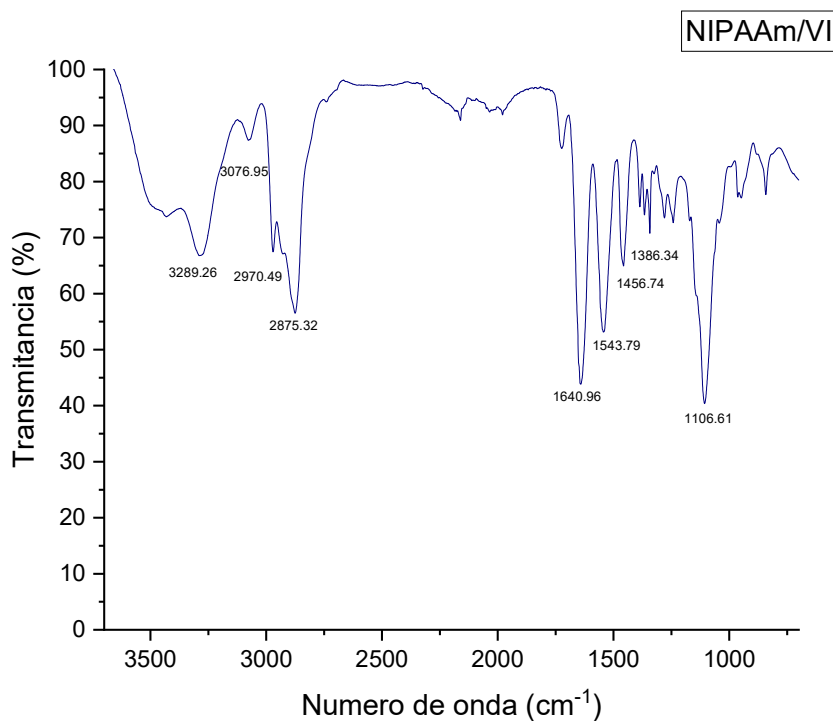


Figura 18. Espectro FT-IR de NIPAAm/VI 10%.

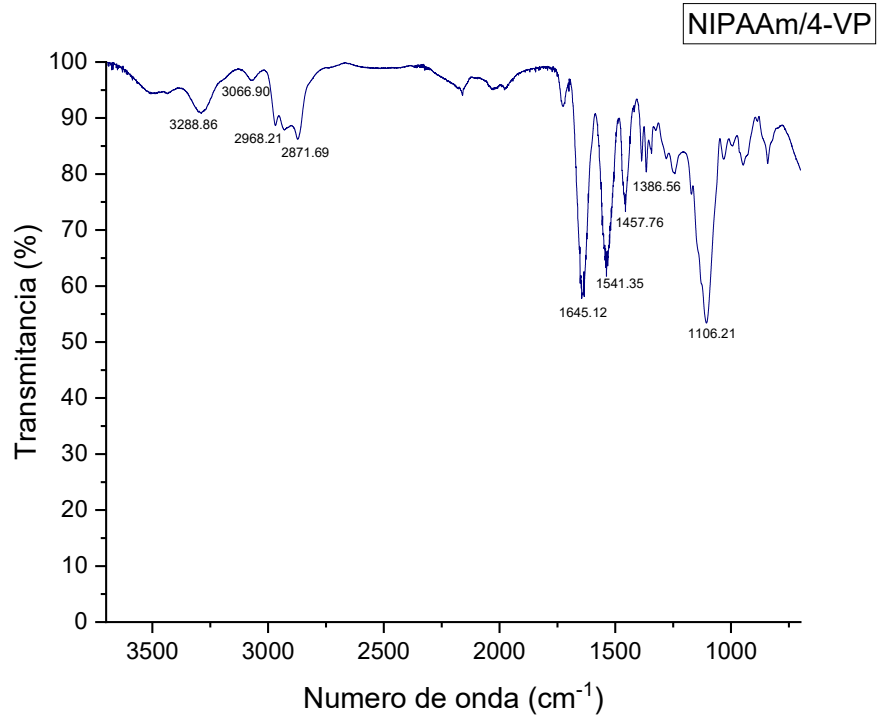


Figura 19. Espectro FT-IR de NIPAAm/4-VP 10%.

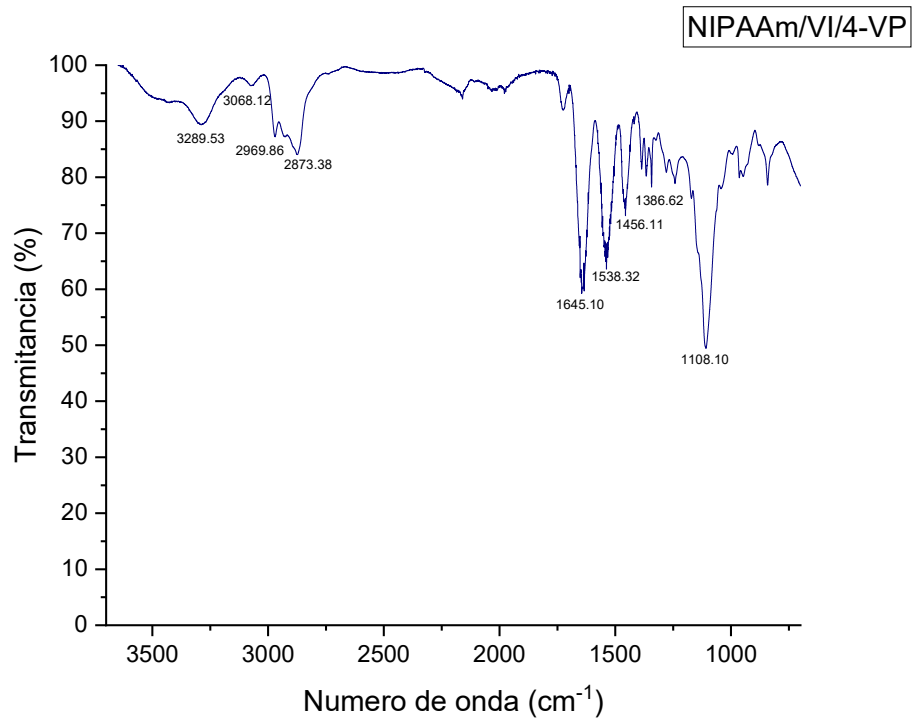


Figura 20. Espectro FT-IR de NIPAAm/VI/4-VP 5%/5%.

V.2.3 Potencial zeta

Se determinó el Potencial Zeta de las distintas formulaciones observándose un comportamiento inversamente proporcional al pH en el cual se encontraba la suspensión, a pH ácidos se encontraron potenciales zetas mayores que descendían a medida que aumentaba el pH, en la tabla 5 se reportan los potenciales zeta de cada formulación.

Tabla 5. Potenciales zeta y sus respectivas desviaciones estándar.

pH	NIPAAm/VI		NIPAAm/VP		NIPAAm/VI/VP	
	PZ (mV)	DE	PZ (mV)	DE	PZ (mV)	DE
3	1.52	0.71	1.55	0.40	2.31	0.23
4	1.35	1.56	1.67	0.16	1.80	0.33
5	1.04	0.77	0.61	0.14	0.36	0.01
6	-2.21	1.13	-0.44	0.30	-0.36	0.19
7	-3.26	0.04	-3.33	0.30	-2.25	0.03
8	-3.47	0.12	-2.66	0.16	-2.39	0.35
9	-3.26	0.04	-2.53	0.19	-3.12	0.73

En la Figura 21 se muestra gráficamente la tendencia del potencial zeta en la formulación NIPAAm/VI 10% donde se observa gráficamente el descenso en el potencial zeta que va desde 1.52 hasta -3.47, el cambio más importante se observó en el pH 6 donde hubo un cambio de 3 mV. En la Figura 22 se puede ver un comportamiento similar con NIPAAm/VP, aunque el descenso más importante se encuentra en el pH 7 bajando 3 mV y siendo el punto más bajo de los estudiados. En la Figura 23 se puede apreciar la

formulación NIPAAm/VI/VP con un descenso que va desde 2.31 hasta -3.12 con su mayor descenso a pH 7 de 2.1 mV. Todas las formulaciones presentaron esta tendencia a la baja y se mantuvieron en los mismos rangos de potencial zeta. De acuerdo a la transición de la carga del potencial zeta se puede observar el punto isoeléctrico de las suspensiones cercano al pH 6.0, debido a que no presentan magnitudes mayores a ± 10 mV, no se puede determinar la carga de las nanopartículas.

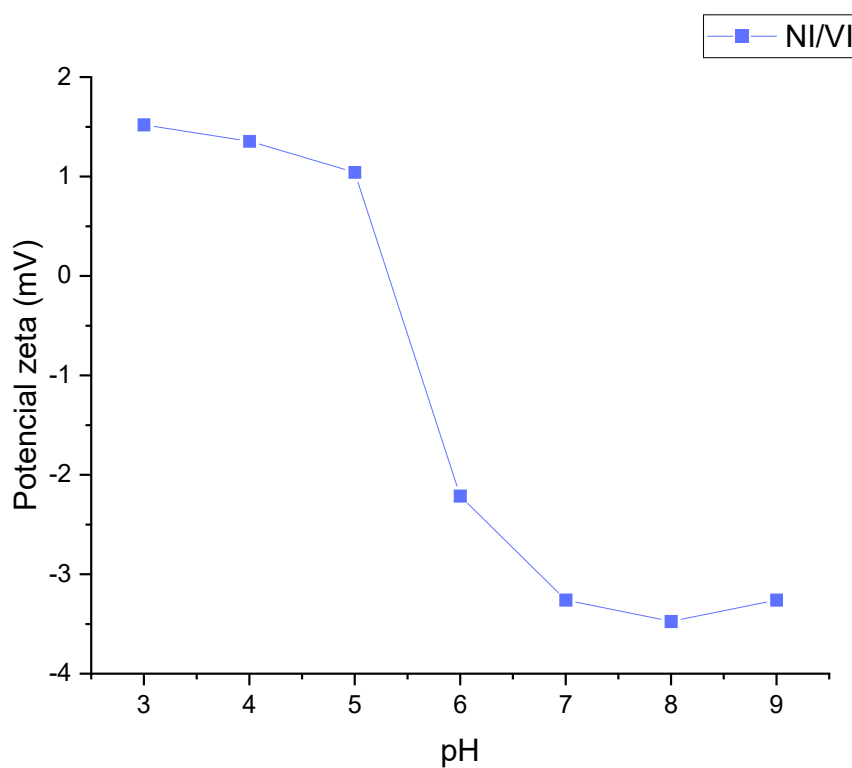


Figura 21. Potencial zeta de NIPAAm/VI 10%.

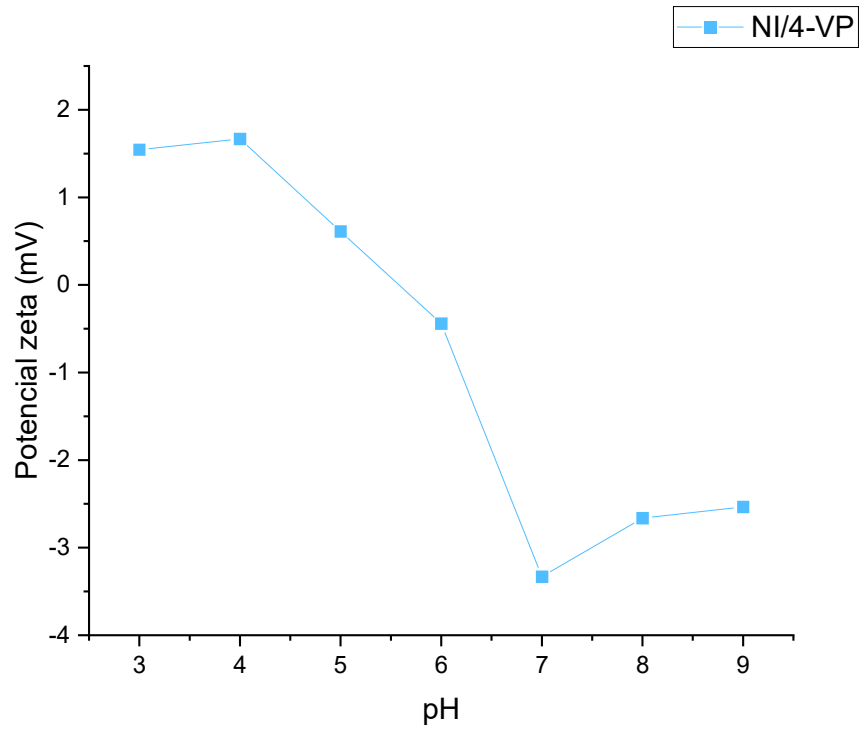


Figura 22. Potencial zeta de NIPAAm/VP 10%.

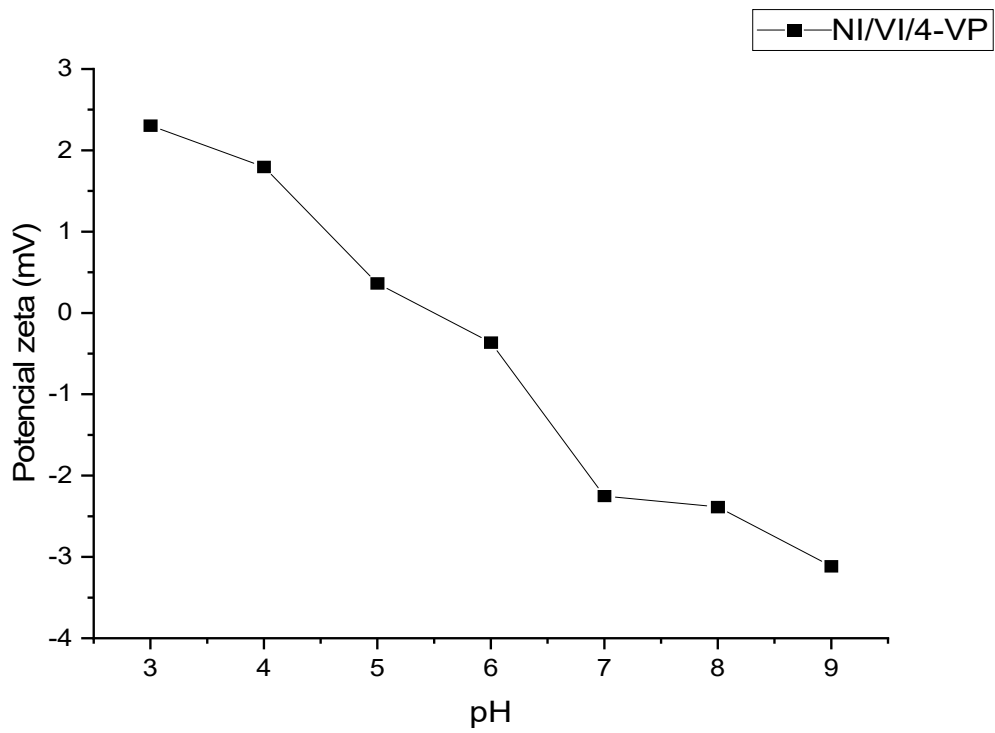


Figura 23. Potencial zeta de NIPAAm/VI/VP 5%/5%.

V.3 Evaluación del efecto de la temperatura y el pH.

V.3.1 Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura en las distintas formulaciones determinándose la temperatura de transición y el descenso de tamaño de las nanopartículas. En la Figura 24 se observa la transición de tamaño de la formulación de NIPAAm/VI 10% que va desde 220 hasta 140 nm con una temperatura de transición de a los 42°C lo cual se observa desplazado con respecto a la de la NIPAAm que se sitúa a 32°C. Para la formulación de NIPAAm/VP 10% se observa una temperatura de transición similar, a 40°C con un desplazamiento en el tamaño que va desde los 256 nm hasta 200 nm, observándose un menor descenso en el tamaño de una manera más escalonada llegando a ser prácticamente estable después de su temperatura de transición como se observa en la Figura 25.

Para la formulación conteniente de ambos monómeros (NIPAAm/VI/VP 5%/5%) se puede observar un descenso más pronunciado variando su tamaño desde los 343 nm hasta los 215 nm con un descenso que inicia alrededor de los 28°C hasta los 40°C con una temperatura de transición a los 34°C.

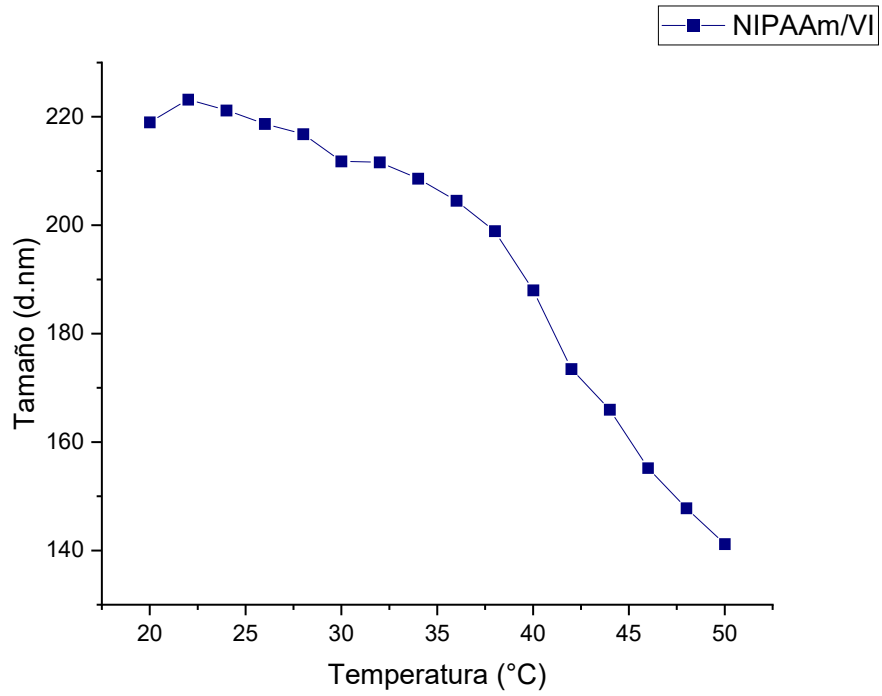


Figura 24. Estudio de tamaño con respecto a la temperatura de NIPAAm/VI 10%.

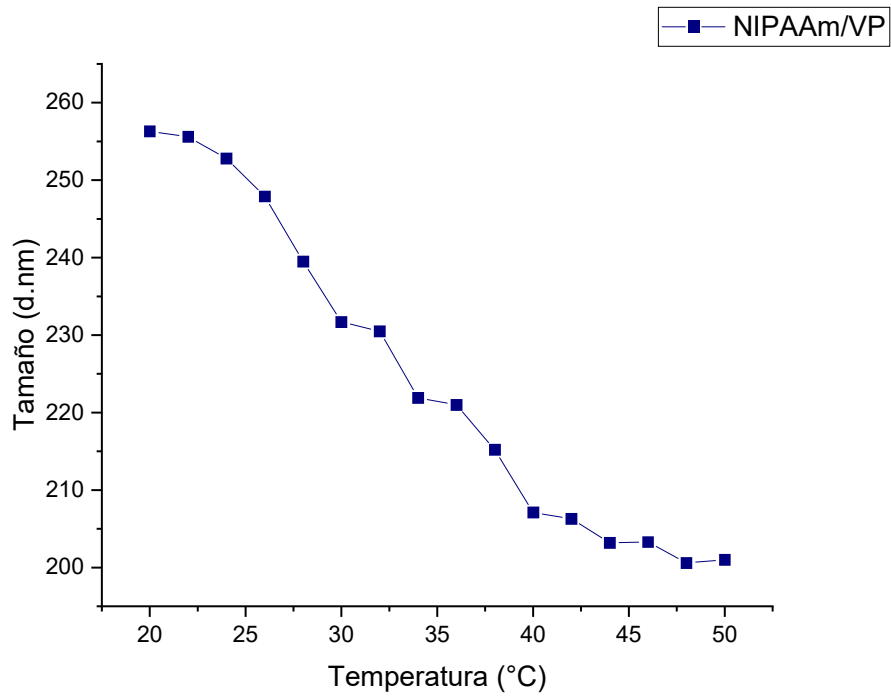
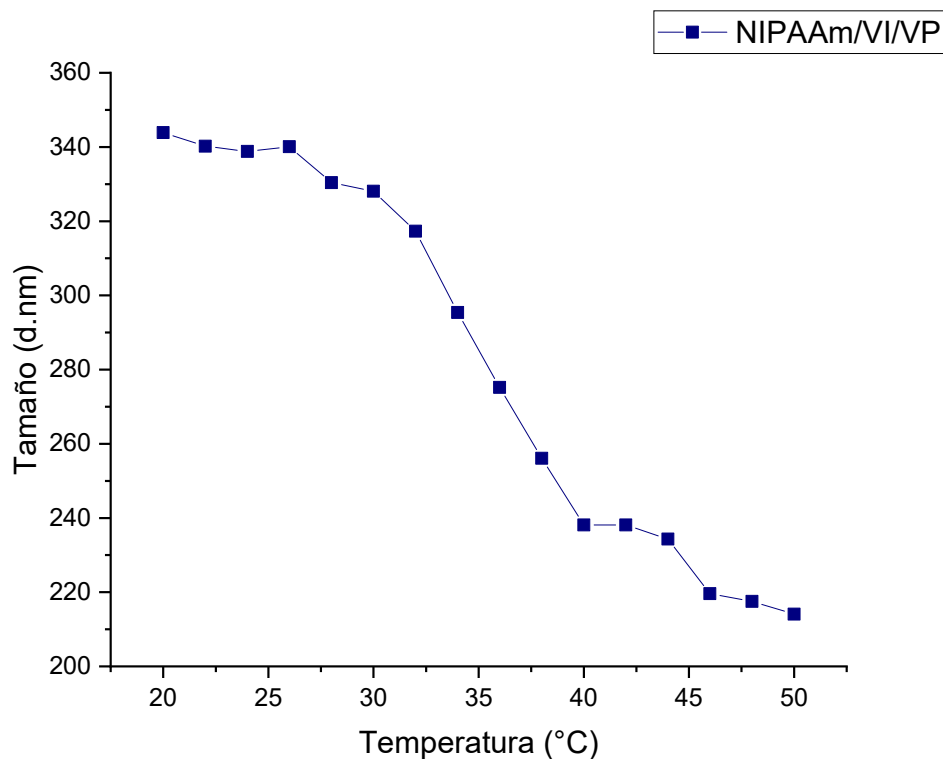


Figura 25. Estudio de tamaño con respecto a la temperatura de NIPAAm/VP 10%.



**Figura 26. Estudio de tamaño con respecto a la temperatura de NIPAAm/VI/VP
5%/5%**

V.3.2 Efecto del pH

La influencia del pH en el tamaño de partícula e índice de polidispersidad se obtuvo a diferentes pH para estudiar su comportamiento en los diferentes medios que pudiera verse involucrado en el cuerpo humano, las variaciones en tamaño de las distintas formulaciones se observan en las Figuras 27, 28 y 29 donde se pueden ver graficas de distribución y en las figuras 30, 31 y 32 se observa la relación del tamaño con respecto al pH. Con NIPAAm/VI 10% observamos un desplazamiento hacia la izquierda en todos los medios que se realizó el estudio, se observan de igual manera disminuciones en el índice de polidispersidad, las condiciones con menor tamaño e índice de polidispersidad

se encontraron a pH 6.8 y 5.0 con tamaños cercanos a los 150 nm y PDI menor a 0.18 observándose un cambio de 70 nm con respecto a la formulación sin buffer.

Para la formulación de NIPAAm/VP 10% se observa un comportamiento distinto al aumentar el tamaño promedio de partícula y el PDI en menor medida, gráficamente se puede observar la diferencia entre las distribuciones al ser de menor intensidad y mayor dispersión, se puede apreciar un ligero desplazamiento hacia la izquierda, a pH 6.8 y 6.0 es donde se ve un mayor desplazamiento donde los tamaños de partícula fueron similares a los de la formulación sin buffer con valores de 212 y 205 respectivamente.

En el estudio de NIPAAm/VI/VP 5%/5% encontramos un desplazamiento hacia la izquierda a los distintos pH, disminuyendo significativamente su PDI sin tener un desplazamiento importante en el tamaño de partícula promedio a pH 6.8 y 6.0 se encontraron menores tamaños de partícula y menor PDI en comparación con las distintas condiciones.

Dentro de las 3 formulaciones encontramos un comportamiento similar al someterlas a las distintas condiciones de pH, siendo de especial importancia los ambientes de pH 6.8 y 6.0 ya que en microambientes tumorales y medios inflamatorios se observa un descenso en el pH con valores cercanos a los anteriormente mencionados, a medida que desciende el pH las nanopartículas muestran una ligera tendencia a la baja en su tamaño de partícula y de igual manera un menor índice de polidispersidad creando una distribución más compacta.

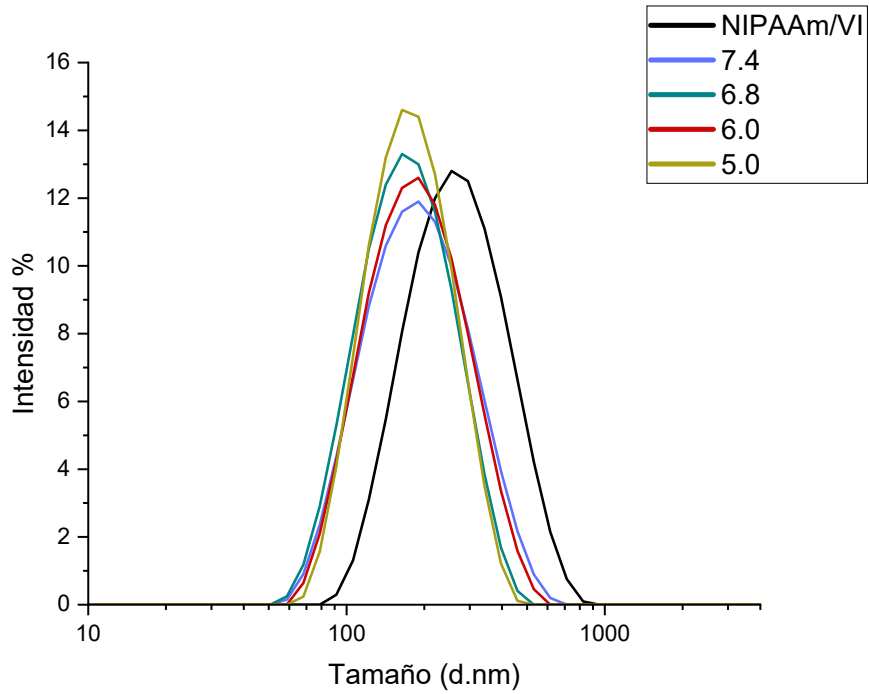


Figura 27. Gráfica de distribución de tamaño de partícula de NIPAAm/VI 10% en distintas condiciones de pH.

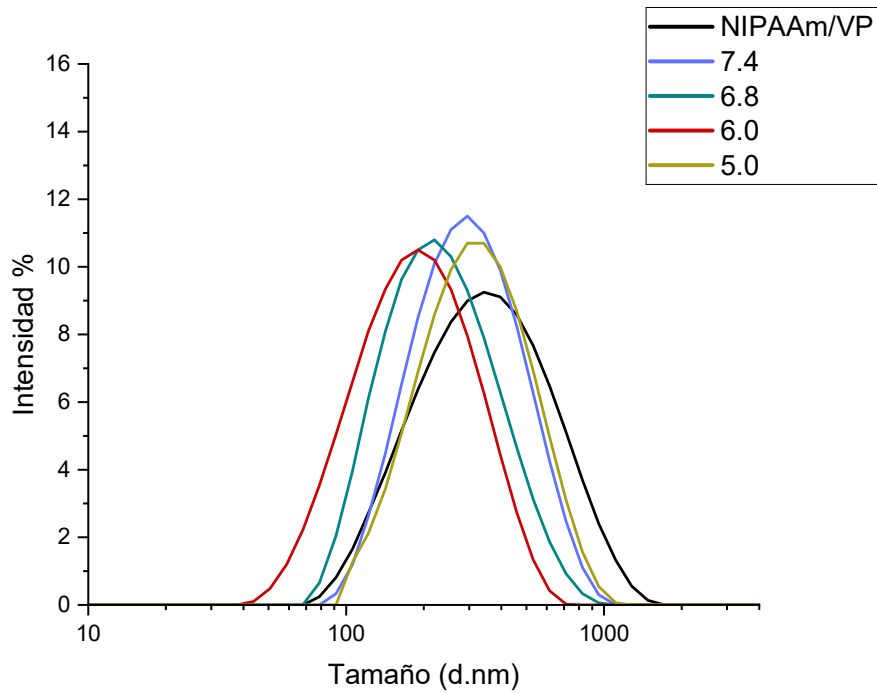


Figura 28. Gráfica de distribución de tamaño de partícula de NIPAAm/VP 10% en distintas condiciones de pH.

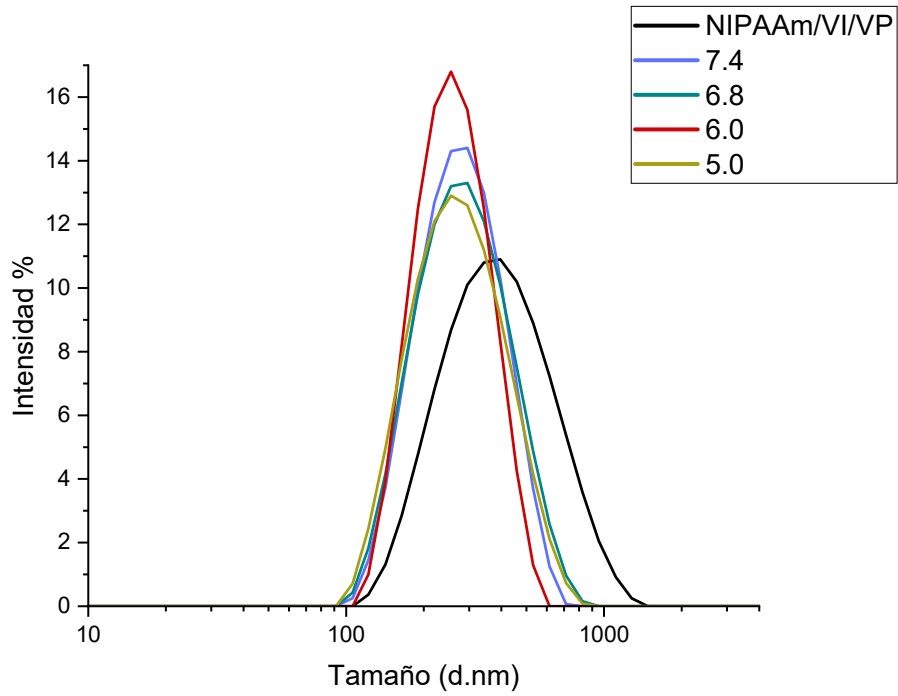


Figura 29. Gráfica de distribución de tamaño de partícula de NIPAAm/VI/VP 5%/5% en distintas condiciones de pH.

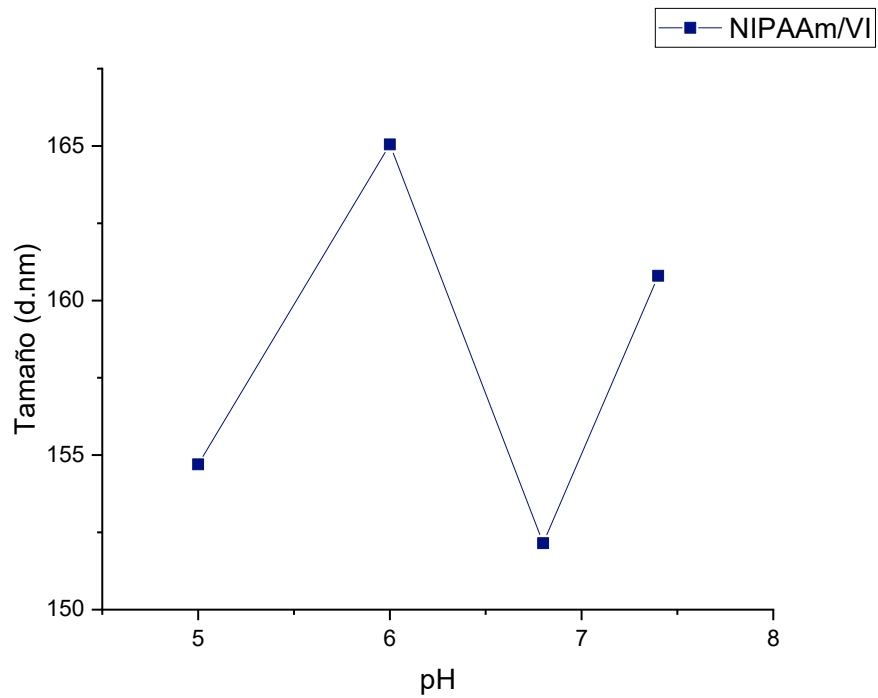


Figura 30. Gráfica de tamaño contra pH de NIPAAm/VI 10%

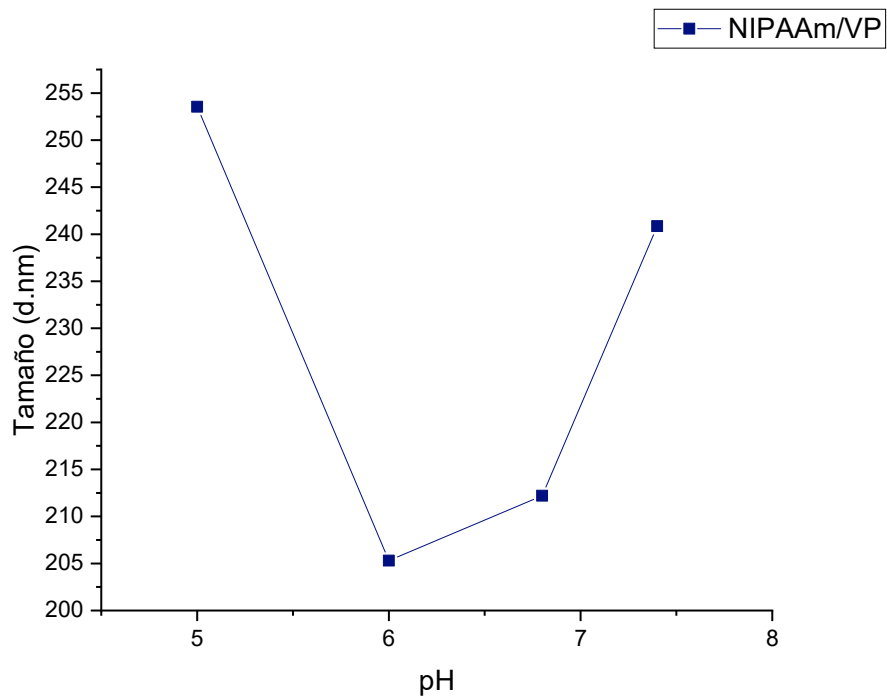


Figura 31. Grafica de tamaño contra pH de NIPAAm/VP 10%

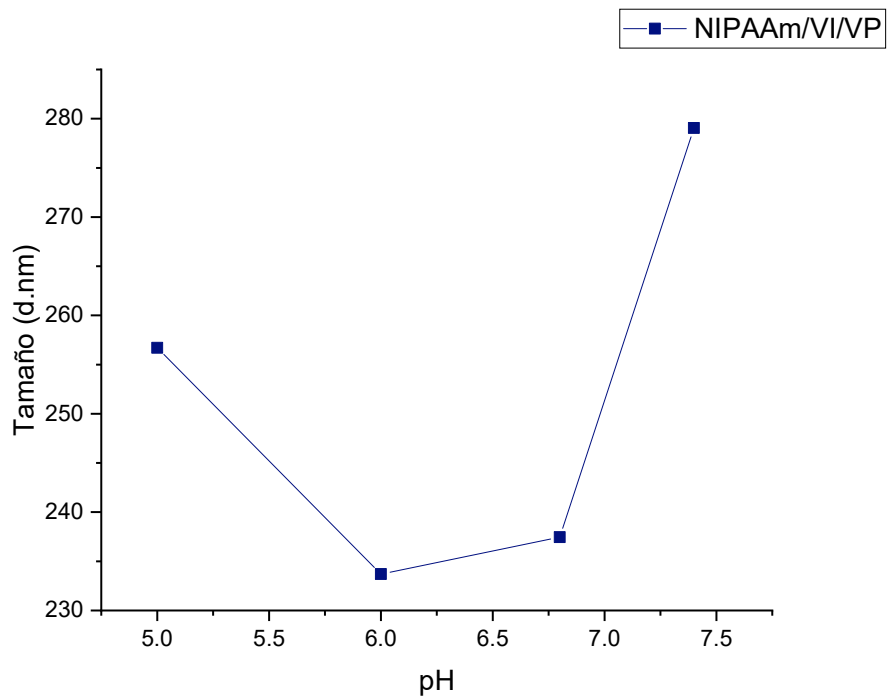


Figura 32. Grafica de tamaño contra pH de NIPAAm/VIVP 5%5%

V.3.3 Efecto de la temperatura y el pH.

La evaluación de la sensibilidad en simultaneo a la temperatura y el pH se realizó mediante la realización de mediciones de tamaño en intervalos de 20 a 50°C en las distintas condiciones de pH para todas las formulaciones, se identificaron los desplazamientos de tamaño y de igual manera de la temperatura de transición.

Como se muestra en la Figura 33, para NIPAAm/VI 10% encontramos un descenso en el tamaño para todas las condiciones de pH yendo desde los con un tamaño a los 20°C de alrededor de 160 nm con un colapso hasta los 110 nm al llegar a los 50°C la temperatura de transición descendió desde los 42°C de la formulación inicial hasta 38 a pH 7.4 y en las condiciones de 6.0 y 5.0 llego hasta los 36 °C.

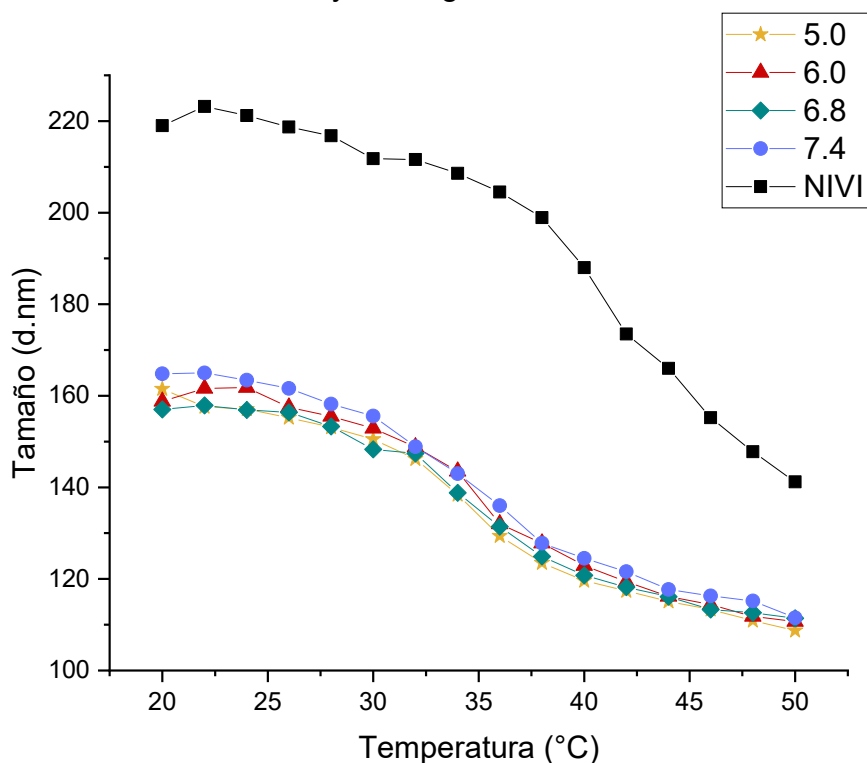


Figura 33. Estudio de tamaño con respecto a la temperatura de NIPAAm/VI 10% en distintas condiciones de pH.

A diferencia de la formulación anterior, en NIPAAm/VP 10% observamos variaciones entre los distintos pH, a pH 7.4 se ve un aumento en el tamaño inicial con respecto a la formulación sin buffer, con tamaño que va desde los 323 nm hasta los 176 nm, situándose su temperatura de transición a los 30°C, a pH 6.8 y 6.0 podemos observar este valor en los 34°C pero con variaciones en el tamaño más pronunciadas que van desde los 208 nm hasta 138 nm para las condiciones de pH 6.8 y a pH 6.0, donde observamos un mayor colapso que varía desde 259 nm hasta 99 nm, en condiciones de mayor acidez, a pH 5.0 se observa un aumento en la temperatura de transición hasta 36°C y un colapso que va desde 253 nm hasta 177 nm.

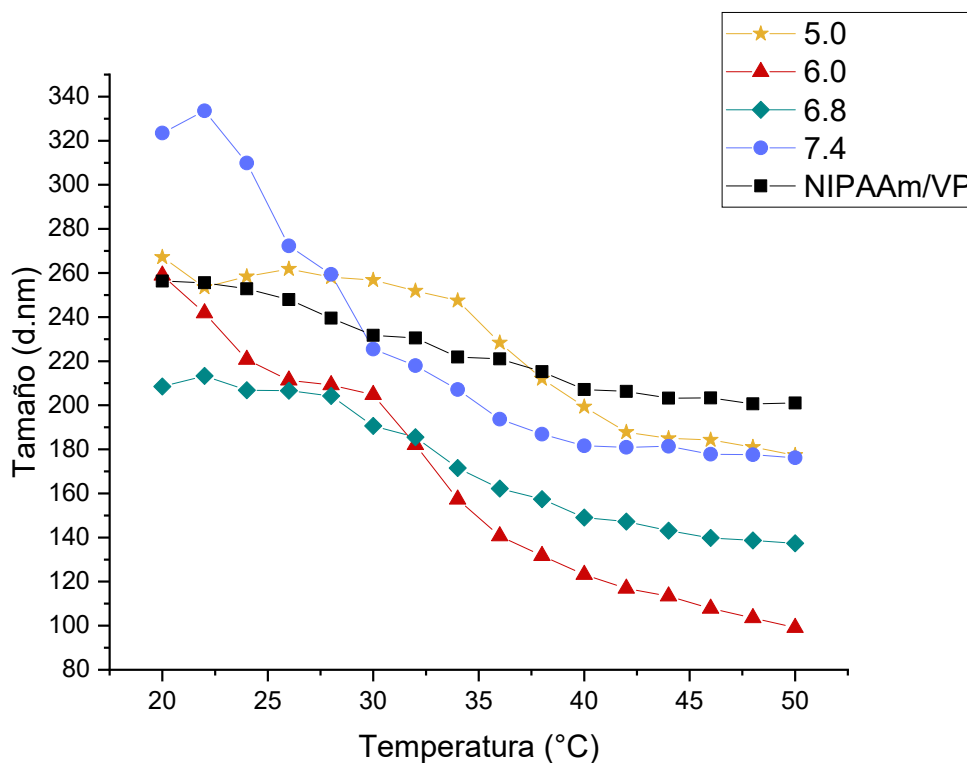


Figura 34. Estudio de tamaño con respecto a la temperatura de NIPAAm/VP 10% en distintas condiciones de pH.

Con NIPAAm/VI/VP 5%/5% observamos un comportamiento similar a la primera formulación al observarse un descenso en los tamaños promedio en las distintas condiciones de pH, la temperatura de transición para la formulación sin buffer se mantiene a 32°C como el polímero de NIPAAm, observándose una transición de tamaño desde los 340 nm hasta 215 nm, en comparación con las distintas condiciones de pH donde se observan en la Figura 30. Para pH 7.4 encontramos una temperatura de transición a los 34°C y un tamaño que va desde 270 nm hasta 170 nm.

A medida que desciende el pH vemos un aumento de la temperatura de transición llegando a 38°C en pH 6.8 y 5.0 con transiciones de tamaño desde 247 nm hasta 155 nm y 256 hasta 163 nm respectivamente. Las condiciones de mayor interés fueron a pH 6.0 donde la temperatura de transición se sitúa a los 40°C y con un descenso de tamaño iniciando a los 240 nm y bajando hasta 155 nm.

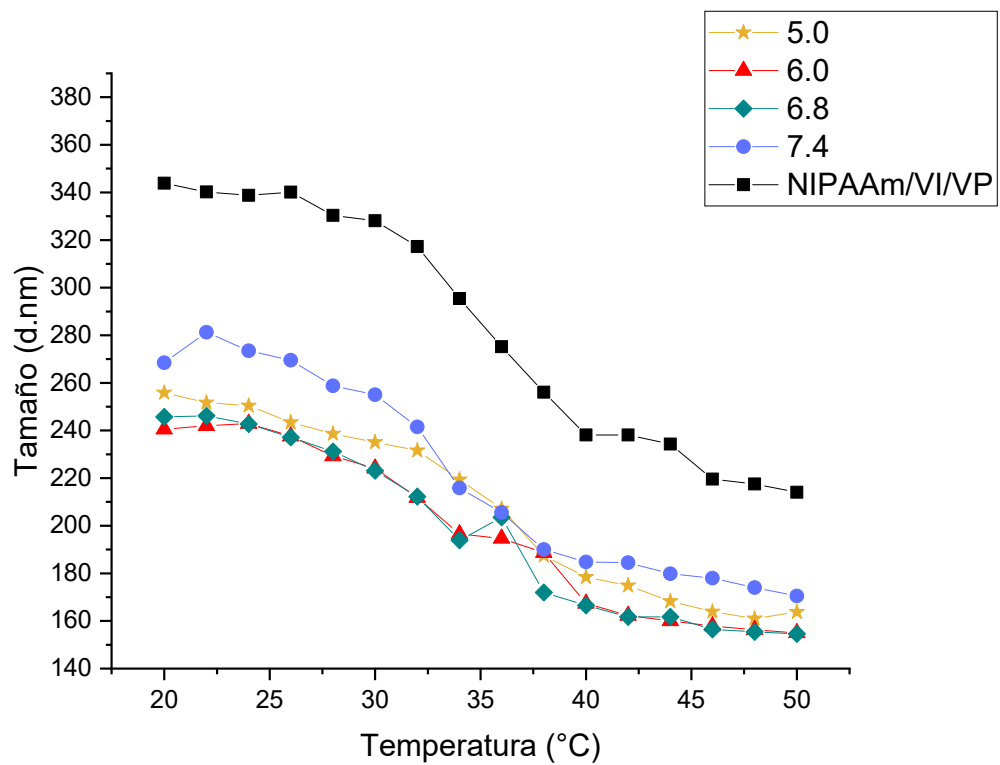


Figura 35. Estudio de tamaño con respecto a la temperatura de NIPAAm/VI/VP 5%/5% en distintas condiciones de pH.

CAPITULO VI CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar distintas formulaciones de nanogeles de NIPAAm estabilizadas con PEGMA y copolimerizado con distintas aminas como monómero secundario como fueron 1-vinilimidazol y 4-vinilpiridina los cuales se polimerizaron a una proporción de 10% molar, utilizando EGDMA como entrecruzante y APS como iniciador aniónico mediante el método de polimerización en emulsión sin detergente, con buen rendimiento y resistencia al proceso de liofilizado.

Se obtuvieron tamaños de partícula para las 3 formulaciones que van desde 203 nm hasta 249 nm con distribuciones unimodales, mediante el análisis por FT-IR se pudo corroborar la correcta polimerización al identificar la presencia de bandas características de los distintos componentes que se utilizaron en la síntesis de las nanopartículas. El análisis del Potencial Zeta permite identificar una transición de la carga de positivo a negativo al pasar de pH 5 a 6, al no presentar valores de magnitudes elevadas esta información no presenta robustez suficiente, esto se puede deber a PEGMA que reduce la densidad de carga superficial, junto con ello el uso de un iniciador aniónico puede contribuir a estos valores tan pequeños.

Se demostró la sensibilidad dual a la temperatura y el pH de las nanopartículas al demostrarse una tendencia de colapso a medida de aumentaba la temperatura, se obtuvo un desplazamiento de la temperatura de transición con respecto al polímero de NIPAAm, para las distintas formulaciones las condiciones favorables fueron a condiciones de pH menores a 7 donde se encontró temperaturas de transiciones cercanas a la temperatura corporal, a pH 5 se encontró una temperatura de transición a los 36°C para las formulaciones NIPAAm/VI y NIPAAm/VP, mientras que para NIPAAm/VI/VP fue de 38°C, la formulación copolimerizada únicamente con VP es de

especial interés debido a la mayor variación que presento frente a las distintas condiciones de pH presentando un colapso a pH 6.0 que ronda los 100 nm.

El incorporar monómeros que contienen aminas terciarias permite dar sensibilidad al pH a este tipo de polímeros, aunado a ello, la capacidad de ionización y cuaternización de estas aminas abre una ventana de posibilidades para su cargado con moléculas de carácter aniónico como puede ser la incorporación de fármacos de carácter ácido o moléculas como ácidos nucleicos entre los que destaca el ARN interferente pequeño.

Para trabajos futuros se pretende evaluar estos nanogeles como sistema de liberación junto con polímeros de vinilaminas para incorporar ácidos nucleicos de tipo ARNip con posibles aplicaciones en tratamiento con terapia genética para pacientes oncológicos.

CAPITULO VII REFERENCIAS

1. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect : Unique features of tumor blood vessels for drug delivery , factors involved , and limitations and augmentation of the effect ☆. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(3):136–151. doi:10.1016/j.addr.2010.04.009
2. Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects ; What Is the Appropriate Target ? *Theranostics.* 2014;4(1). doi:10.7150/thno.7193
3. Biswas S, Torchilin VP. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;66:26–41. doi:10.1016/j.addr.2013.11.004
4. Aguilar A, Caamaño M, Martín FR, Montejo M. *Biofarmacia y Farmacocinética II.* 2da ed. Elsevier España; 2014.
5. Lozano M del C, Córdoba D, Córdoba M. *Manual de tecnología farmacéutica.* Elsevier España; 2012.
6. Nalwa HS. A special issue on reviews in nanomedicine, drug delivery and vaccine development. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(9):1635–1640. doi:10.1166/jbn.2014.2033
7. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles : a boon to drug delivery , therapeutics , diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2012;8(2):147–166. doi:10.1016/j.nano.2011.05.016
8. Qureshi MA, Khatoon F. Different types of smart nanogel for targeted delivery. *J Sci Adv Mater Devices.* 2019;4(2):201–212. doi:10.1016/j.jsamd.2019.04.004
9. Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):1–33. doi:10.1186/s12951-018-0392-8
10. Rane AV, Kanny K, Abitha VK, Thomas S. *Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites.* Elsevier Ltd.; 2018. doi:10.1016/b978-0-08-101975-7.00005-1
11. Serrano-medina A, Cornejo-bravo JM, Licea-claverie A. Synthesis of pH and temperature sensitive , core – shell nano / microgels , by one pot , soap-free emulsion polymerization. *J Colloid Interface Sci.* 2012;369(1):82–90. doi:10.1016/j.jcis.2011.12.045
12. Tarabukina E, Rozanova A, Filippov A, Constantin M, Harabagiu V, Fundueanu G. Thermo- and pH-responsive phase separation of N-isopropylacrylamide with 4-vinylpyridine random copolymer in aqueous solutions. *Colloid Polym Sci.* 2018;296(3):557–565. doi:10.1007/s00396-018-4269-z
13. Zhou X, Zhou Y, Nie J, et al. Thermosensitive ionic microgels via surfactant-free emulsion copolymerization and in situ quaternization cross-linking. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(6):4498–4513. doi:10.1021/am500291n
14. Don KPÆ, Lee H, Na ÆK. Transplantation of poly (N -isopropylacrylamide- co-vinylimidazole) hydrogel constructs composed of rabbit chondrocytes and growth factor-loaded nanoparticles for neocartilage formation. Published online 2009:337–346. doi:10.1007/s10529-008-9871-6
15. Kandasamy G, Danilovtseva EN, Annenkov V V, Krishnan UM. Poly(1-vinylimidazole) polyplexes as novel therapeutic gene carriers for lung cancer therapy. *Beilstein J Nanotechnol.* 2020;11:354–369. doi:10.3762/bjnano.11.26
16. Danilovtseva EN, Zelinskiy SN, Pal VA, Kandasamy G. Poly (1-vinylimidazole) Prospects in Gene Delivery. *Chinese J Polym Sci.* 2019;37:637–645.

17. Greish K, Mathur A, Bakhiet M, Taurin S. Nanomedicine : is it lost in translation ? *Newlands Press*. Published online 2018.
18. Tiwari G, Tiwari R, Bannerjee S, et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*. 2012;2(1):2. doi:10.4103/2230-973x.96920
19. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Drug Delivery Systems. Published 2016. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/drug-delivery-systems-getting-drugs-their-targets-controlled-manner>
20. Saallah S, Lenggoro IW. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder Part J*. 2018;2018(35):89–111. doi:10.14356/kona.2018015
21. Ramirez Casas CM, Franco Gil ME. Sistemas parenterales recargables para la liberación sostenida de fármacos . *Univ Complut Madrid*. Published online 2017.
22. Anton N. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol*. 2019;71:1185–1198. doi:10.1111/jphp.13098
23. Wang X, Li S, Shi Y, et al. The development of site-specific drug delivery nanocarriers based on receptor mediation. *J Control Release*. 2014;193:139–153. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.028
24. Salahpour Anarjan F. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures and Nano-Objects*. 2019;19:100370. doi:10.1016/j.nanoso.2019.100370
25. Smerkova K, Dolezelikova K, Bozdechova L, Heger Z, Zurek L, Adam V. Nanomaterials with active targeting as advanced antimicrobials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2020;12(5):1–25. doi:10.1002/wnan.1636
26. Britannica., The Editors of Encyclopaedia. Polymer. Encyclopedia Britannica. Published 2021. Consultado marzo 21, 2022. <https://www.britannica.com/science/polymer>.
27. Chang R, Eseyin, Anthonia E, Steele, Philip H, Chang R, Soewarno N. Raymond Chang - Chemistry, Tenth Edition (2009, McGraw-Hill). *Int J Adv Chem*. 2015;3(2).
28. Young RJ, Lovell PA. *Introduction to Polymers*. 3rd ed. CRC Press; 2011. doi:<https://doi.org/10.1201/9781439894156>
29. Campbell IM. *Introduction to Synthetic Polymers*. 2a ed. Oxford University Press; 2000.
30. Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Curr Drug Deliv*. 2012;9(4):367–394. doi:<https://doi.org/10.2174/156720112801323053>
31. Gil ES, Hudson SM. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci*. 2004;29(12):1173–1222. doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.08.003>
32. Bae you han, Okano T, Kim SW. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N'-alkyl substituted acrylamides) in water. *J Polym Sci*. 1990;28(6):923–936. doi:<https://doi.org/10.1002/polb.1990.090280609>
33. Ruel-Gariépy E, Leroux J-C. In situ-forming Hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):409–426. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.019>
34. Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;53(3):321–339. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00203-4)

35. Heskins M, Guillet JE. Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci.* 1968;2(8):1441–1455. doi:<https://doi.org/10.1080/10601326808051910>
36. Liu Z, Liao Q, Yang D, et al. Well-defined poly(N-isopropylacrylamide) with a bifunctional end-group: Synthesis, characterization, and thermoresponsive properties. *Des Monomers Polym.* 2013;16(5):465–474. doi:10.1080/15685551.2012.747165
37. Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release.* 2008;126(3):187–204. doi:10.1016/j.jconrel.2007.12.017
38. Santanakrishnan S, Hutchinson RA. Free-radical polymerization of N-vinylimidazole and quaternized vinylimidazole in aqueous solution. *Macromol Chem Phys.* 2013;214(10):1140–1146. doi:10.1002/macp.201300044
39. Sahiner N, Yasar AO. The generation of desired functional groups on poly(4-vinyl pyridine) particles by post-modification technique for antimicrobial and environmental applications. *J Colloid Interface Sci.* 2013;402:327–333. doi:10.1016/j.jcis.2013.03.032
40. Sahiner N, Atta AM, Yasar AO, Al-Lohedan HA, Ezzat AO. Surface activity of amphiphilic cationic pH-responsive poly(4-vinylpyridine) microgel at air/water interface. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;482:647–655. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.07.035
41. Raczowska J, Stetsyshyn Y, Awsiuk K, et al. Temperature-responsive properties of poly(4-vinylpyridine) coatings: Influence of temperature on the wettability, morphology, and protein adsorption. *RSC Adv.* 2016;6(90):87469–87477. doi:10.1039/c6ra07223b
42. National Nanotechnology Initiative. About Nanotechnology. Published 2011. Consultado marzo 10, 2022. <https://www.nano.gov/about-nanotechnology>
43. Chan WCW. Nanomedicine 2.0. *Acc Chem Res.* 2017;50(3):627–632. doi:10.1021/acs.accounts.6b00629
44. Thakor AS, Gambhir SS. Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(6):395–418. doi:10.3322/caac.21199
45. Shaji J, Lal M. Nanocarriers for targeting in inflammation. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013;6(SUPPL.3):3–12.

CAPITULO VIII ANEXOS

Tabla 6. Componentes de formulación NIPAAm/VI 10%.

Formulación de NIPAAm/VI 10% relación NIPAAm/PEGMAm 7:3					
% de activador	2	% de comonomero	10	% de entrecruzante	3
Componente	Masa (g)	Moles	Densidad	Dilución	Volumen (uL)
NIPAAm	0.35	3.09E-03			
PEGMAm	0.15	7.21E-05	1.078	50%	278.2931354
1-VI	0.02978658	3.17E-04	1.038		28.69612544
EGDMA	0.02070362	1.04E-04	1.05		19.71773179
APS	0.01588997	6.96E-05			

Tabla 7. Componentes de formulación NIPAAm/VP 10%.

Formulación de NIPAAm/VP 10% relación NIPAAm/PEGMAm 7:3					
% de activador	2	% de comonomero	10	% de entrecruzante	3
Componente	Masa (g)	Moles	Densidad	Dilución	Volumen (uL)
NIPAAm	0.35	3.09E-03			
PEGMAm	0.15	7.21E-05	1.078	50%	278.2931354
4-VP	0.03327766	3.17E-04	0.984		33.81876286
EGDMA	0.02070362	1.04E-04	1.05		19.71773179
APS	0.01588997	6.96E-05			

Tabla 8. Componentes de formulación NIPAAm/VI/VP 5%/5%.

Formulación de NIPAAm/VI/VP 5%/5% relación NIPAAm/PEGMAm 7:3					
% de activador	2	% de comonomeros	5	% de entrecruzante	3
Componente	Masa (g)	Moles	Densidad	Dilución	Volumen (uL)
NIPAAm	0.35	3.09E-03			
PEGMAm	0.15	7.21E-05	1.078	50%	278.2931354
1-VI	1.49E-02	1.58E-04	1.038		14.34806272
4-VP	0.01663883	1.58E-04	0.984		16.90938143
EGDMA	0.02070362	1.04E-04	1.05		19.71773179
APS	0.01588997	6.96E-05			

Tabla 9. Temperaturas de transición de las distintas formulaciones a diferentes pH.

Temperatura de transición (°C)					
Formulación	pH				
	Sin pH	5.0	6.0	6.8	7.4
NIPAAm/VI	42	36	36	34	38
NIPAAm/VP	40	36	34	34	30
NIPAAm/VI/VP	34	38	40	38	34