

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**Sistemas Termoresponsivos Microestructurados para la
Liberación de Fármacos**

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M.C. Kenia Palomino Vizcaíno

Director de Tesis:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

TIJUANA, B.C

JUNIO 2018

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 245

Tijuana, B. C., a 17 de mayo de 2018

C. Kenia Palomino Vizcaíno
Pasante de: Doctor en Ciencias
Presente

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

Es propuesto, por el C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema Sistemas Termoresponsivos Microestructurados para la Liberación de
Fármacos

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

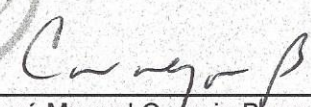
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- METODOLOGÍA
- III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- IV.- CONCLUSIONES
- V.- REFERENCIAS
- VI.- ANEXOS

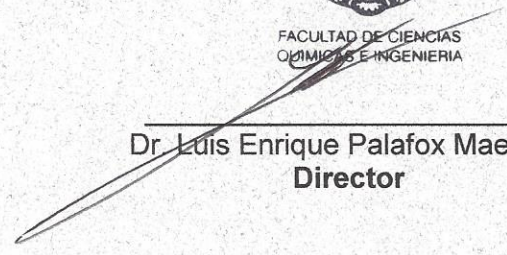
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. José Luis González Vázquez
Sub-Director Secretario


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

AGRADECIMIENTOS

El principal agradecimiento es para mi familia que me ha apoyado en todo momento a seguir preparándome y dar lo mejor cada día, a mis padre Rogelio Palomino Álvarez y Martha Patricia Vizcaino López, a mi hermano Giovanni Palomino Vizcaino.

Dr. José Manuel Cornejo Bravo, se agradece de manera infinita la confianza, tiempo, paciencia, apoyo y disposición para guiarme en el camino de la investigación, así como siempre tratar de enseñarme a ver las cosas de diferentes puntos de vista, por su amistad y profesionalismo a lo largo de estos años.

Al Dr. Emilio Bucio Carrillo, Dr. Luis Marat Álvarez Salas, Dr. Yasuhiko Tabata y Dr Junichiro Jo por abrir las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad, confianza, tiempo y disposición de trabajo que ayudaron a mi formación académica a través de las experiencias brindadas. Al Dr Ignacio Alfredo Rivero Espejel de Instituto Tecnológico de Tijuana por la adquisición de imágenes de SEM y STEM.

A todos mis compañeros de posgrado por su apoyo y amistad en todo momento y ayudar a través de todos estos años de compañía, así como al grupo de Biofarmacia por siempre apoyarme en todo momento. A todos los profesores que a lo largo de mi formación académica han sido parte fundamental en mi desarrollo y me impulsaron a enfrentar nuevos retos.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar, a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQI), en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI), y principalmente al laboratorio de Biofarmacia por brindarme la oportunidad, las instalaciones y abrir las puertas para realizar el doctorado en ciencias, así como a todo su personal que ha sido importante en la realización de este trabajo.

De igual forma se agradece a las siguientes instituciones: al Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Universidad de Kioto, Japón por el apoyo recibido en las estancias de investigación durante el periodo doctoral.

A CONACYT por la beca de doctorado otorgada por el periodo de estudios, así como la beca mixta. Así mismo el trabajo fue apoyado por la 20^{va} convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación UABC.

ÍNDICE

	Página
Hoja de aprobación	II
Agradecimientos	III
Índice	V
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	VII
Lista de ecuaciones	VIII
Resumen	IX
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
I.1 Teoría general	2
I.2 Antecedentes	4
I.3 Justificación	5
I.4 Hipótesis	7
I.5 Objetivo general	7
I.6 Objetivo específico	7
CAPÍTULO II	
METODOLOGÍA	9
II.1 Purificación de N-isopropilacrilamida	10
II.2 Síntesis de monómeros 2-MBA y 4-MBA	10
II.3 Síntesis de microgeles de NIPAAm y copolímeros	12
II.4 Liofilización	12

II.5	Reconstitución	13
II.6	Preparación de hidrogeles	13
II.7	Estudios de cinética de hinchamiento	13
II.8	Estudio de contracción	14
II.9	Estudio de cinética de hinchamiento/contracción	14
II.10	Estudio de hinchamiento con función a la temperatura	15
II.11	Cargado del hidrogel	15
II.12	Estudios de liberación	16
II.13	Técnicas de caracterización	16
II.13.1	Dispersión de luz dinámica (DLS)	16
II.13.2	Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR)	17
II.13.3	Microscopia electrónica de barrido (STEM)	17
CAPÍTULO III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
III.1	Síntesis de hidrogeles microestructurados de NIPAAm	19
III.2	Síntesis de microgeles copoliméricos con ajuste de temperatura de transición	27
III.2.1	Microgeles con grupos ácidos anfifílicos	27
III.2.2	Microgeles con grupos ácidos hidrofílicos no ionizables	30
III.3	Hidrogeles microestructurados con ajuste de la temperatura de transición	32
CAPÍTULO IV	CONCLUSIONES	42
CAPÍTULO V	REFERENCIAS	47
CAPÍTULO VI	ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

No.		Página
1	Caracterización de microgeles de NIPAAm con 2-MBA en diferentes porcentajes	27
2	Caracterización de microgeles de NIPAAm con sal de 2-MBA en diferentes porcentajes	28
3	Caracterización de microgeles de NIPAAm con 4-MBA en diferentes porcentajes	29
4	Caracterización de microgeles de NIPAAm con sal de 4-MBA en diferentes porcentajes	29
5	Caracterización de microgeles de NIPAAm con grupos ácidos hidrofílicos no ionizables	31
6	Temperatura de transición de hidrogeles microestructurados	33

ÍNDICE DE FIGURAS

No.		Página
1	Ruta de síntesis de a) 2-MBA y b) 4-MBA	10
2	Imágenes de SEM a) hidrogel sin MG y b) hidrogel con MG	19
3	Grado de hinchamiento dependiente de la temperatura de 20 °C a 50 °C	20
4	Grado de hinchamiento de hidrogeles	21
5	Proceso de contracción de hidrogeles a 42 °C	22
6	Proceso de hinchamiento/contracción de hidrogeles en ciclos de temperatura de 25 °C y 42 °C	23
7	Representación del comportamiento teórico de los hidrogeles microestructurados de NIPAAm	24
8	Liberación de vitamina B ₁₂ en ciclos de temperatura de 25 °C y 42 °C	25
9	Liberación de citocromo c en ciclos de temperatura de 25 °C y 42 °C	26
10	Microscopia de STEM de a) NIPAAm/AAm y b) NIPAAm/DMA en proporción del 10%	31
11	Imágenes de SEM de hidrogeles a) NIPAAm/DMA(20%) y b) NIPAAm/DMA(20%) con 30%MG NIPAAm/AAm(20%)	34

12	Grado de hinchamiento de hidrogeles microestructurados	34
13	Proceso de contracción de hidrogeles microestructurados	35
14	Proceso de hinchamiento/contracción de hidrogeles microestructurados en ciclos de temperatura, a) 25 °C y 42 °C y b) 37 °C y 42 °C.	36
15	Liberación de vitamina B ₁₂ en hidrogeles microestructurados en ciclos de temperatura, a) 25 °C y 42 °C y b) 37 °C y 42 °C	38
16	Liberación de citocromo C en hidrogeles microestructurados en ciclos de temperatura, a) 25 °C y 42 °C y b) 37 °C y 42 °C	40

ÍNDICE DE ECUACIONES

No.		Página
1	Grado de hinchamiento	14

RESUMEN

Este trabajo se divide en tres partes: en la primera parte se prepararon hidrogeles termosensibles de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) microestructurados con diferentes proporciones de microgeles (MG) de NIPAAm. Estos materiales presentaron una contracción rápida por encima de 32°C, la cual es una temperatura transición (Ttr) relacionada al LCST (temperatura critica de disolución inferior). El proceso de contracción e hinchamiento fue reversible entre 25 °C y 42 °C, lo cual fue adecuado para la liberación con control positivo y pulsátil de solutos tales como vitamina B₁₂ y citocromo C. La incorporación de microgeles además mejoro las propiedades mecánicas de los hidrogeles.

En una segunda parte, se buscó ajustar la Ttr de los microgeles de NIPAAm por arriba de la temperatura corporal (37 °C) con el objetivo de desarrollar materiales microestructurados que respondieran por arriba de dicha temperatura. Para lograr esta característica se prepararon microgeles copoliméricos de NIPAAm con ácidos anfifílicos (ácido metacriloil-o-benzoico y ácido metacriloil-p-benzoico), y con monómeros hidrofílicos no ionizables: acrilamida (AAm) y dimetilacrilamida (DMA). Los resultados mostraron que la copolimerización con los ácidos anfifílicos producen microgeles sensibles al pH y la temperatura, pero no es posible ajustar la Ttr por arriba de los 37 °C, mientras que con los monómeros hidrofílicos es posible alcanzar transiciones arriba de 39 °C.

Con los resultados anteriores se realizó la tercera parte del proyecto que consistió en generar hidrogeles microestructurados con la temperatura de transición ajustada

por arriba de la temperatura corporal. Para esto se utilizaron los microgeles sintetizadas en la segunda parte y se prepararon hidrogeles copoliméricos de NIPAAm con DMA y AAm, los cuales mantienen su comportamiento reversible entre hinchamiento y contracción donde se obtiene una respuesta ante el cambio de temperatura de 37 °C a 42 °C, sin embargo, el cambio del grado de hinchamiento es menor que el cambio entre 25 °C a 42 °C. Los estudios en la liberación son rápidas con macromoléculas, se muestra que vitamina B₁₂ no tiene un control de temperatura, sin embargo, con una molécula de mayor tamaño como lo es citocromo C se mantiene un control dependiente de la temperatura.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

II. 1 TEORÍA GENERAL

En los últimos años la investigación farmacéutica se enfoca en la mejora y desarrollo de nuevos sistemas de liberación que optimicen la entrega de los tratamientos terapéuticos[1], esto lleva consigo el desarrollo de diferentes áreas como química, polímeros, biotecnología, nanotecnología, entre otras. El éxito que estos muestran es debido a los beneficios económicos y terapéuticos mediante la liberación controlada en dispositivos más pequeños, mejora en el control de tiempo de liberación así como la ubicación específica de los sistemas en el organismo[2].

Existen materiales inteligentes que tienen la capacidad de responder a estímulos externos como temperatura, pH, fuerza iónica y voltaje[3–5], a su vez estos muestran su respuesta como hinchamiento/contracción, flexión, cambio de color, cambio de estado, luminiscencia y conductividad[6]. Estos materiales se producen a partir de polímeros los cuales son la unión de cientos de moléculas llamadas monómeros, los cuales pueden ser de un material en específico (homopolímero) o son llamados copolímeros cuando tiene unidades de dos o más diferentes monómeros. Los polímeros pueden tener diferentes formas como los son lineales, ramificadas, tridimensionales, entre otros[7]. La combinación de monómeros se realiza ya que se pueden modificar las propiedades y características de estos para lograr características deseadas y tener nuevas aplicaciones.

Los hidrogeles son redes tridimensionales hidrófilas compuesta de polímeros los cuales son química o física entrecruzados[8], estos tienen una excelente capacidad de hinchamiento, donde el agua actúa como vínculo entre los grupos hidrófilos o

cubre el espacio entre las cadenas de la red, estos tienen una similitud con el tejido blando lo cual es una opción para implantes biomédicos, productos farmacéuticos, cultivo celular, ingeniería de tejido, músculos artificiales, apósitos y diagnóstico de heridas[9–11], debido a sus propiedades de contenido de agua, suavidad, flexibilidad y biocompatibilidad[12–14].

Los materiales sensibles a la temperatura tienen un punto crítico donde el polímero en forma de hidrogel responde a lo que se llama temperatura crítica inferior de solución (LCST), esto significa que el hidrogel por debajo de su LCST se encuentra hinchado y por encima de esta se contrae. Estas propiedades brindan un amplio rango de aplicación en diferentes campos además de biomateriales, como sistemas de membranas, válvulas y sensores[15].

Uno de los materiales termosensibles más estudiados es NIPAAm sus hidrogeles muestran una LCST de 32 °C[16,17] con un cambio de hinchado a colapsado, esta se encuentra cerca de la temperatura corporal. Estas propiedades de los hidrogeles de NIPAAm los potencializa para la liberación de fármacos[18,19] debido a la temperatura de transición de NIPAAm se puede ajustar para que esta sea por encima de la temperatura corporal por medio de copolimerización con monómeros hidrófilos o ionizables[20–23] y con ellos aplicarlo como una liberación controlada a temperatura positiva (incremento en la temperatura), esta es una característica importante para fines de aplicación, es bien conocido que la temperatura corporal por encima de lo normal se experimenta en algunas patologías, o puede ser inducido localmente o sistémicamente[24,25]. Sin embargo, los hidrogeles presentan problemas en sus propiedades mecánicas[26], en la tasa de

respuesta[27], y la formación de una piel en la superficie del hidrogel[28].

Principalmente la liberación de fármacos de manera pulsada se considera muy importante para dar mejor efecto terapéutico de diferentes molecular bioactivas, como hormonas, proteínas y péptidos[29–31]. Para lo cual se requieren materiales sensibles a la temperatura con liberación pulsada manejando una temperatura de transición mayor a 37 °C pero inferior a los 42 °C.

II. 2 ANTECEDENTES

En los últimos años la industria farmacéutica ha desempeñado una función fundamental en el descubrimiento, modificación y mejoramiento de los tratamientos terapéuticos, principalmente tratar de eliminar reacciones adversas, la toxicidad y baja entrega[32].

Se cuentan con diferentes modalidades de liberación de los fármacos como sostenida, controlada, pulsátil, entre otras; las cuales buscan que la liberación se lleve en el sitio de acción, tiempo adecuado y velocidad deseada[33]. Este tipo de liberación se pueden llevar a cabo mediante la incorporación o modificación en sistemas donde por medio de polímeros inteligentes son diseñados en diferentes tamaños y estructuras como nanopartículas, micropartículas, microcápsulas e hidrogeles[34,35] para lograr un sistema modificado.

La liberación de fármacos de manera contralada por medio de pulsos se considera un área de oportunidad muy importante, esta puede ser capaz de mejorar el efecto

terapéutico de muchas moléculas bioactivas, principalmente hormonas [29,30,36] en las cuales una liberación en pulsos es necesaria para brindar un efecto deseado.

Sin embargo, los sistemas actuales que utilizan materiales inteligentes sufren deficiencias, en especial el caso de los hidrogeles son materiales con un amplio potencial, pero muestran deficiencias en las propiedades mecánicas[26] y su lenta tasa de respuesta[27]. Los hidrogeles a base de NIPAAm han sido muy estudiados debido a sus propiedades de respuesta ante la temperatura de 32 °C. Para lograr una respuesta rápida la estrategia en estos se ha basado en la producción de microporos que expulsaran el contenido del hidrogel cuando esta experimente una contracción[28,37–39], sin embargo, estos muestran ser una estructura poco confiable debido a la posible ruptura durante su aplicación, lo cual provocaría una liberación inmediata del contenido[40].

II. 3 JUSTIFICACIÓN

La investigación en sistemas de liberación del laboratorio de biofarmacia en FCQI de UABC, se encuentran desarrollando nuevos sistemas utilizando diferentes materiales inteligentes que se caracterizan principalmente por su respuesta a la temperatura y/o pH, estos son sintetizados en diversas formas como nanopartículas, microgeles e hidrogeles, entre otros, los cuales ayudaran a la formación de nuevos y mejorados sistemas de liberación.

En particular en esta investigación se busca encontrar las condiciones adecuadas para la liberación de macromoléculas mediante una liberación pulsátil regulada por cambios en el entorno que se producen por enfermedades, ciclos circadianos o inducido externamente, principalmente temperatura y pH.

Los hidrogeles de NIPAAm han sido estudiados anteriormente sin embargo se pretende mejorar las condiciones de los anteriormente estudiados a través de la incorporación de microgeles para mejorar su resistencia mecánica y velocidad de reacción, los microgeles introducen inhomogeneidad en los materiales provocando poros por los cuales las soluciones acuosas embebidas son expulsada con la contracción del hidrogel, semejante al proceso que se observa cuando se comprime una esponja. Por otra parte, los microgeles introducen sitios de entrecruzamiento que incrementan la resistencia mecánica de los materiales.

A su vez se pretende la modificación de los hidrogeles y microgeles por separado y en conjunto, mediante la copolimerización con diferentes monómeros para observar el efecto que estos tienen sobre los sistemas y lograr un aumento en la temperatura de transición superior a la corporal, pH determinado y con la velocidad adecuada.

II. 4 HIPÓTESIS

Los hidrogeles de NIPAAm microestructurados con microgeles de NIPAAm tienen una respuesta rápida a cambios en la temperatura y pueden utilizarse para la liberación pulsátil de fármacos. La temperatura de transición puede ajustarse a una respuesta positiva de la liberación

II. 5 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar sistemas de hidrogeles microestructurados con respuesta rápida a la temperatura, con capacidad de liberar macromoléculas de manera controlada. Ajustar la temperatura de transición por arriba de la temperatura corporal para un control positivo de la liberación.

II. 6 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a. Preparar microgeles de NIPAAm y copolímeros con ajuste de temperatura de transición.
- b. Preparar hidrogeles con diferentes porcentajes de microgeles de NIPAAm.
- c. Preparar hidrogeles con copolímeros con un ajuste de temperatura mayor a 37°C
- d. Preparar hidrogeles de microestructurados con ajuste de temperatura de transición.

- e. Estudiar el grado de hinchamiento con respecto a la temperatura y determinar la temperatura de transición.
- f. Estudiar las cinéticas de hinchamiento, colapso e hinchamiento/colapso de estos a diferentes temperaturas y respecto al tiempo.
- g. Realizar el cargado de los geles con macromoléculas de diferente peso molecular y estudiar la cinética de liberación con ciclos de temperatura.

CAPÍTULO II

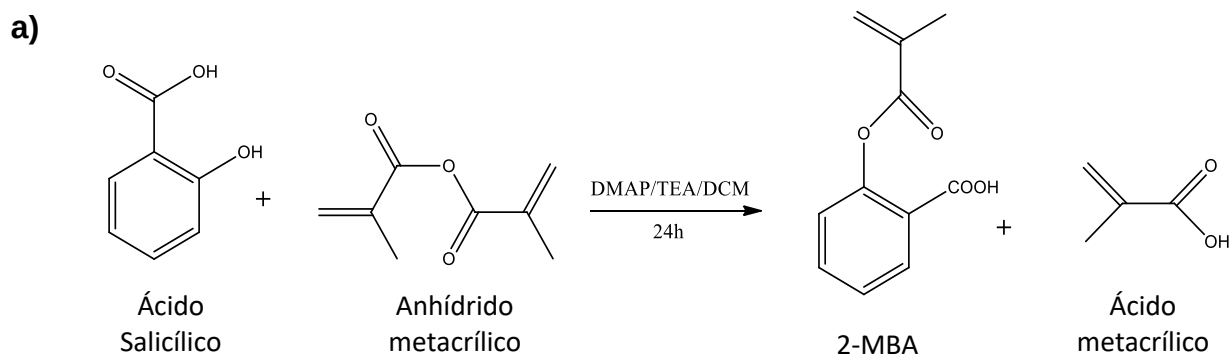
METODOLOGÍA

II. 1 PURIFICACIÓN DE N-isopropilacrilamida

El monómero de NIPAAm se adquiere con un inhibidor de polimerización, se realiza una purificación con hexano, el cual se calienta hasta 45 °C y se filtra en caliente. Una vez cristalizado el contenido se filtró a vacío, realizando lavados con hexano frío obteniendo la NIPAAm purificada.

II.2 SÍNTESIS DE MONÓMEROS, Ácido-2-metacriloiloxibenzoico (2-MBA) y Ácido-4-metacriloiloxibenzoico (4-MBA)

La reacción de síntesis generales de los monómeros 2-MBA y 4-MBA se muestra en la Figura 1. Se pesan 25 g de ácido salicílico o ácido 4-hidroxibenzoico en un matraz, se pesan 1.77 g de 4-dimetilaminopiridina, y se colocan 72 mL de diclorometano estos se agitan y posteriormente se agregan 30.4 mL de trietilamina de manera lenta y continua. Esto es colocado en un baño de hielo donde se adicionan 26.21 mL de anhídrido metacrílico gota a gota por aproximadamente 4 horas a 0 °C, una vez terminada la adición se deja en agitación a temperatura ambiente por 24 horas.



b

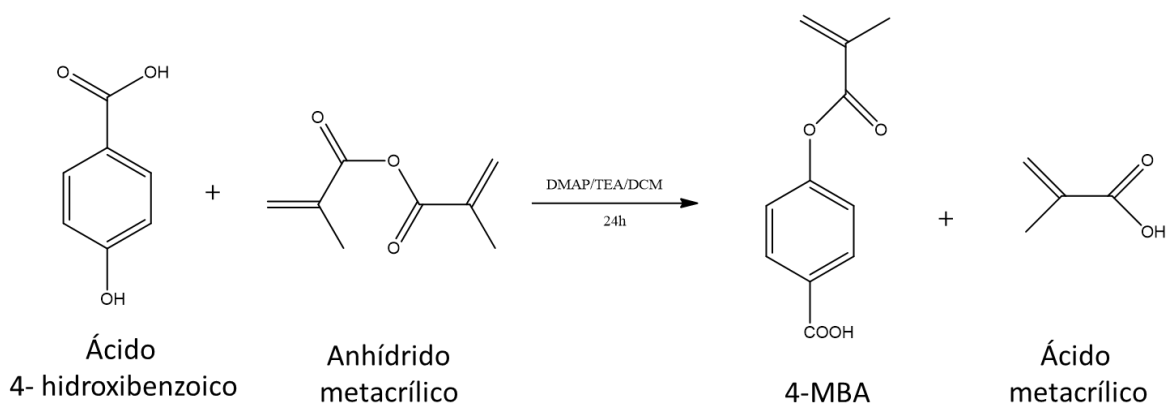


Figura 1. Ruta de síntesis de (a) ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (2-MBA) y (b) ácido 4-metacrililoiloxibenzoico (4-MBA)

Para la extracción se acidifica la disolución, esta se coloca en un embudo de separación utilizando éter etílico para extraer 2-MBA, la fase orgánica obtenida se coloca a 0 °C es filtrado a vacío y se obtiene un sólido el cual es purificado con lavados de agua a 25 °C y agua a 40 °C intercalándolos. Para obtener 4-MBA se precipita con éter de petróleo los sólidos se colocan a 34 °C, los sólidos son caracterizados por FTIR.

La preparación de la sal de potasio de los monómeros se realiza pesando 0.98 g del monómero, en otro vaso es colocado 0.26 g de hidróxido de potasio y se disuelven en metanol, estos son agitados y una vez que están totalmente disueltos se colocan en baño de hielo, posteriormente se agrega gota a gota la disolución de hidróxido de potasio al monómero hasta obtener un precipitado.

II.3 SÍNTESIS DE MICROGELES DE NIPAAm Y COPOLÍMEROS

La síntesis de microgeles se lleva a cabo en disolución que contienen NIPAAm y sus diferentes comonómeros acrilamida (AAm), dimetilacrilamida (DMA), 2-MBA y 4-MBA, estos son preparados con diferentes porcentajes según se plantea, como agente entrecruzante se utiliza dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) 5% molar manteniendo esta mezcla en agitación constante y aplicando un burbujeo de nitrógeno por 30 min la disolución se coloca a 80°C, una vez alcanzada la temperatura se adicionó el iniciador de la polimerización persulfato de amonio (APS) al 2% w/w y se mantiene a 80°C por 45 minutos, finalmente se retira y se coloca en un baño de hielo para detener la reacción.

La disolución fue purificada por diálisis contra agua destilada usando una membrana de corte molecular de 12,000 a 14,000 g/mol y posteriormente se liofilizo. Los microgeles obtenidos se analizan por dispersión de luz dinámica (Zetazizer NS) para conocer su tamaño y temperatura de transición.

II.4 LIOFILIZACIÓN

Las muestras purificadas son congeladas en viales las cuales se colocan en un vaso porta muestra del equipo (LABCONCO). Las muestras son de aproximadamente 15 mL y se liofilizan por 2.5 días.

II.5 RECONSTITUCIÓN

Los microgeles liofilizadas se reconstituyen con el volumen necesario en agua destilada manteniendo una concentración igual a la inicial de aproximadamente 1% w/v.

II.6 PREPARACIÓN DE HIDROGELES

Para preparar los hidrogeles mediante polimerización en disolución vía radicales libres, estos se obtienen en forma de lámina delgada entre dos placas de vidrio con un espaciador de 1 mm. En las diferentes preparaciones de hidrogeles se utilizó agua destilada como medio de disolución, *N-N*-metilenbisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante. Una disolución acuosa 0.15 mol/L de APS como iniciador y como catalizador de la reacción se utilizó TEMED al 0.15 mol/L, los hidrogeles se lavaron con agua por 24 horas y son cortados con un diámetro de 1 cm.

La preparación de hidrogeles microestructurados se agregan los microgeles de diferentes copolímeros y porcentajes, y posteriormente se continua con el mismo proceso de síntesis.

II.7 ESTUDIOS DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO

La finalidad de este estudio es conocer los cambios en el grado de hinchamiento de los diferentes geles con respecto al tiempo, donde se obtiene el peso del hidrogel seco, se colocó el disco en un vial con 10 mL de agua destilada a 25 °C con agitación

constante, se procedió a pesar el gel a diferentes tiempos 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 y 1440 minutos, con cuidado y eliminando el agua excedente de cada gel antes de ser pesado.

Con los datos adquiridos se calculó gravimétricamente el grado de hinchamiento, en base al agua absorbida, comparando el peso del gel hinchado y seco, conforme la ecuación 1 que nos muestra el grado de hinchamiento donde Q es el grado de hinchamiento, Wh peso del hidrogel hinchado y Ws peso del hidrogel seco.

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_s} \quad (1)$$

II.8 ESTUDIO DE CONTRACCIÓN

Este se realiza pesando el hidrogel seco, se procedió al hinchamiento en equilibrio a 25°C en agua destilada y posteriormente se inicia el estudio colocando el hidrogel en 10 mL de agua destilada a 42 °C, y se procede al pesado a diferentes tiempos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 minutos, con los datos obtenidos se analizan utilizando la Ecuación 1.

II.9 ESTUDIO DE CINÉTICA DE HINCHAMIENTO/CONTRACCIÓN

Estos se realizan en dos temperaturas una de 25 °C y 42 °C o 37 °C y 42 °C. Los geles se pesaron en seco y se colocan 24 horas en agua destilada para que se encuentre en equilibrio, esto se realiza con temperatura controlada y agitación

constante. Se procede a colocar el hidrogel a 42 °C durante una hora sacando el hidrogel cada 15 minutos y posteriormente es pesado, el proceso se repite a 25 °C, esto durante las 7 horas de muestreo.

Una vez terminados estos experimentos se procedió a obtener el grado de hinchamiento de cada uno de los hidrogeles obteniendo la cinética de hinchamiento y contracción del hidrogel.

II.10 ESTUDIO DE HINCHAMIENTO EN FUNCIÓN A LA TEMPERATURA

Este estudio se realizó con el propósito de observar el comportamiento de los diferentes hidrogeles ante el cambio de temperatura con lo cual se determinará la temperatura crítica de transición (T_{tr}). Se obtiene el peso en seco, se colocan 5 mL de agua destilada, se inicia el estudio a 50 °C hasta lograr el punto de equilibrio y se procede al descenso de temperatura paulatinamente cada 2 °C hasta llegar a 20 °C procediendo a tomar el peso de cada hidrogel en cada intervalo de temperatura.

II.11 ESTUDIO CARGADO DE HIDROGELES

Los hidrogeles se pesan en seco y se colocan en disoluciones de vitamina B₁₂ (10mg/mL) y citocromo C (1mg/mL), permitiendo que se alcance el equilibrio. Estas moléculas fueron elegidos por su peso molecular y su absorbancia en UV-Visible facilitando su cuantificación por espectroscopia UV/Vis.

II.12 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN

Previo a los estudios de liberación, se realizó una curva de calibración para la vitamina B₁₂ y citocromo C, por medio de espectrofotometría con detección en el UV/Vis a una longitud máxima de absorción de 361 nm y 528 nm respectivamente, como medio se utilizó disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7.4 esta se preparó de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos[41].

La metodología para los experimentos de liberación fue la siguiente: en un vial se colocaron 3 mL de buffer en agitación constante con temperatura controlada de 25 °C, 37 °C o 42 °C según sea lo requerido.

Una vez colocadas en temperatura de añade el hidrogel a estudiar y se toman alícuotas de 1 mL cada 15 min, una vez transcurrida la hora se obtiene el hidrogel y se colocaba en el vial con cambio de temperatura, los cuales se repiten por 7 horas hasta lograr los 3 ½ ciclos, una vez terminados estos ciclos se mantiene por 24 horas. Las muestras extraídas determinan la cantidad de fármaco liberado.

II.13 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

II.13.1 DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

El tamaño de partícula se determina tomando 1 mL del producto de la reacción a 1% w/v, la cual se transfiere a una celda transparente la cual se coloca en el equipo Zetasizer NS a una temperatura de 25 °C.

La determinación del tamaño de partícula respecto al cambio de temperatura se realiza con la muestra al 1% w/v con un cambio de temperatura cada 2 °C iniciando en 20 °C hasta 50 °C.

Estos análisis se realizan en agua destilada o una gama de amortiguadores de diferentes pH de 3, 5, 7, 7.4 y 9, según sea requerido.

II.13.2 ESPECTROSCOPIAS DE INFRARROJO (FTIR-ATR)

Esta técnica se utiliza para la detección de los grupos funcionales principales. La muestra hidrogeles o microgeles son colocados en el equipo de manera integral por medio del módulo de ATR, se coloca sobre la placa y es analizada con un barrido de 4000 a 450 cm^{-1} , todos los espectros obtenidos fueron normalizados.

II.13.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (STEM)

La morfología de los hidrogeles y microgeles se obtiene por medio del microscopio modelo JSM-7800F prime. Los hidrogeles se analizaron liofilizados mientras que los microgeles son preparados a 0.4%w y colocadas en una rejilla de cobre, las cuales se secaron a 22 °C en vacío durante 24 horas, y estas son sujetadas y se insertaron en la cámara de muestra y se observaron a 25 Kv.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

III. 1 SÍNTESIS DE HIDROGELES MICROESTRUCTURADOS DE NIPAAm

Los resultados de esta sección fueron reportados en el artículo “Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery” K. Palomino, K. A. Suarez-Meraz, A. Serrano-Medina, A. Olivas, E.C. Samano, J.M. Cornejo-Bravo, Journal Polymer Research, 22, 199 (2015) ver anexo A, se resumen los principales resultados a continuación.

Los microgeles obtenidos a base de NIPAAm mostraron un tamaño de partícula por medio de dispersión de luz dinámica de 585 nm a 25 °C, estas muestran una temperatura de transición de 32 °C característicos de este polímero. Los hidrogeles microestructurados fueron preparados con diferentes porcentajes de microgeles 0, 7.5, 15 y 30 % identificados como 100:0, 92.5:7.5, 85:15 y 70:30 y uno de 85:15 D con doble cantidad de entrecruzante.

El hidrogel que no contiene microgeles es frágil y transparente, mientras que el resto que contiene MG son opacos incrementándose conforme aumenta el porcentaje incorporado ya que se introduce heterogeneidad durante la síntesis, estos fueron observados por SEM (Figura 2), la cual nos muestra que con el aumento de las microgeles aumenta la porosidad del hidrogel.

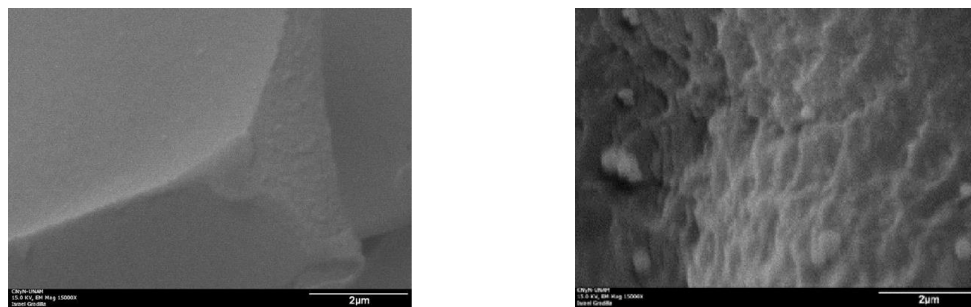


Figura 2. Imágenes de SEM a) Hidrogel sin MG y b) Hidrogel con MG

El grado de hinchamiento (Q) de los hidrogeles fue medido de 20 °C a 40 °C (Figura 3), en los cuales a 20 °C tiene el mayor grado de hinchamiento y va decayendo conforme aumenta la temperatura dando un colapso abrupto a los 32 °C en todos los hidrogeles. Sin embargo, la capacidad de hinchamiento muestra diferencia significativa entre los hidrogeles el de mayor capacidad es 70:30, siguiendo los hidrogeles 100:0, 92.5:7.5 y 85:15 y finalmente 85:15 D, debido a una mayor densidad de reticulación y, por tanto, una mayor fuerza elástica contra el hinchamiento.

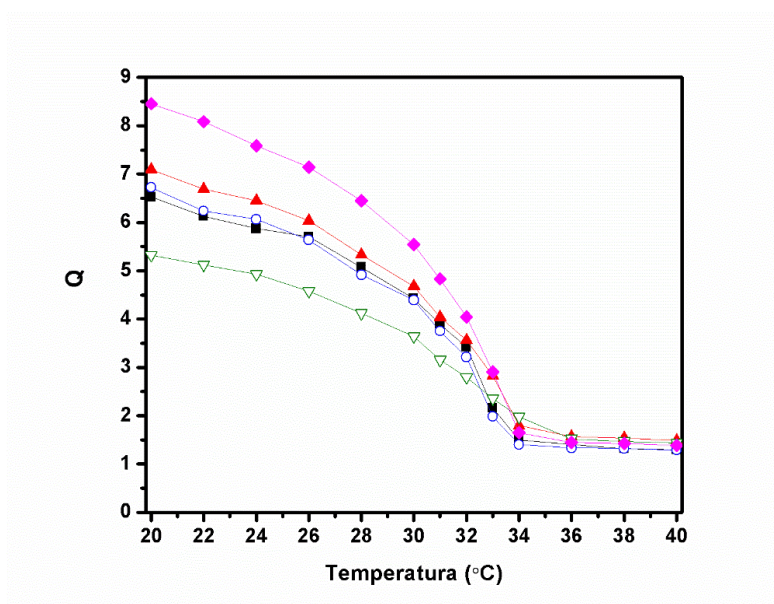


Figura 3. Grado de hinchamiento dependiente de la temperatura: (-■-) NIPAAm/MG 100:0, (-○-) NIPAAm/MG 92.5:7.5, (-▲-) 85:15 NIPAAm/MG, (-▽-) 85:15 D NIPAAm/MG, (-◆-) 70:30 NIPAAm/MG

La capacidad de hinchamiento a través del tiempo corrobora los datos obtenidos, la Figura 4 muestra que se alcanza el mismo grado de hinchamiento a 25 °C mantenidos por 24 horas garantizando su máximo hinchamiento. Sin embargo, el

tiempo en el que se llega al máximo punto de hinchamiento es más lenta para el hidrogel 85:15 D en relación con el resto.

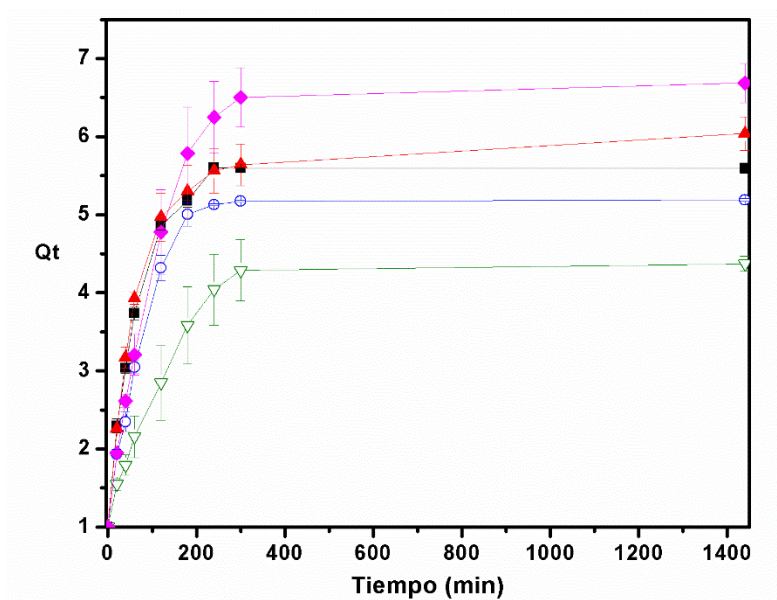


Figura 4. Grado de hinchamiento de hidrogeles: (■) NIPAAm/MG 100:0, (○) NIPAAm/MG 92.5:7.5, (▲) 85:15 NIPAAm/MG, (▽) 85:15 D NIPAAm/MG, (◆) 70:30 NIPAAm/MG

La cinética de contracción en la Figura 5 nos muestra el proceso en el cambio de 25 °C a 42 °C, donde los hidrogeles sin microgeles 100:0 se observa la formación de una capa blanca conforme a lo reportado, lo que impide la contracción del hidrogel dando solamente un 20% de contracción con respuesta lenta. Siguiendo el proceso los hidrogeles de 92.5:7.5 el cual contiene la menor cantidad de microgeles los cuales evitan la formación de esta barrera y con ello favorece el tiempo de respuesta. Sin embargo, los hidrogeles 85:15 y 70:30 se observa una capacidad de contracción del 90% y 85:15 D llega a un 80% con una respuesta inmediata al cambio de temperatura lo cual favorece el sistema de liberación. Esto ocurre debido

a la contracción rápida y expulsión agua a través de los poros de los hidrogeles. Lo que nos indica que incorporar 7.5% de microgeles no obtiene la suficiente formación de poros necesaria para que se permita la expulsión completa del agua cuando el hidrogel se contrae a una temperatura superior a la LCST.

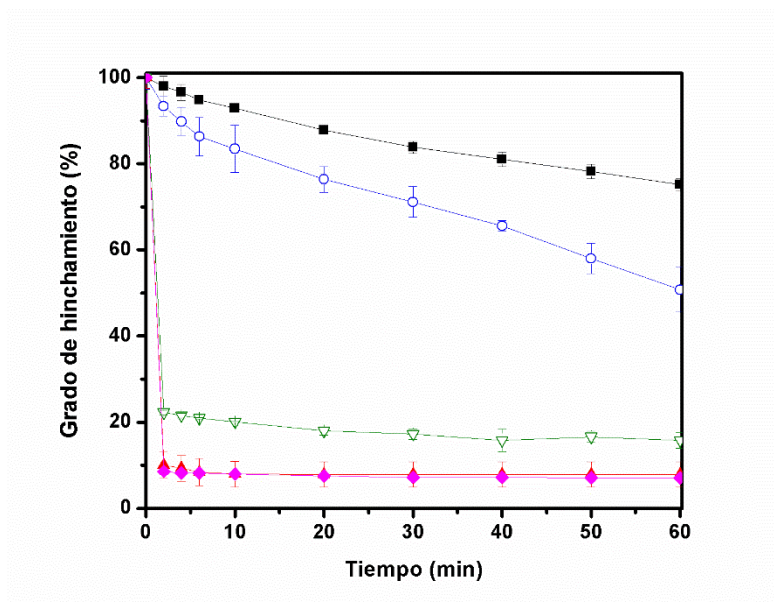


Figura 5. Proceso de contracción de hidrogeles a 42°C: (-■-) NIPAAm/MG 100:0, (-○-) NIPAAm/MG 92.5:7.5, (-▲-) 85:15 NIPAAm/MG, (-▽-) 85:15 D NIPAAm/MG, (-◆-) 70:30 NIPAAm/MG

El estudio del proceso de contracción e hinchamiento se realizan cambiando de 40 °C a 25 °C muestreando cada hora donde la Figura 6 se observa que el hidrogel 100:0 tiene una pequeña variación en el grado de hinchamiento en cada ciclo complementado con la formación de la piel lo cual limita su respuesta al cambio de temperatura.

El hidrogel de NIPAAm 92.5:7.5 muestra una contracción mayor al de hinchamiento mostrando que el proceso de hinchamiento no es suficiente para recuperar el estado inicial durante los cambios de temperatura. Las curvas para el resto de los hidrogeles muestran un comportamiento oscilante muy similar entre ellas, de modo que las curvas de hinchamiento/contracción se muestran reproducibles a través de los ciclos en cada oscilación de temperatura.

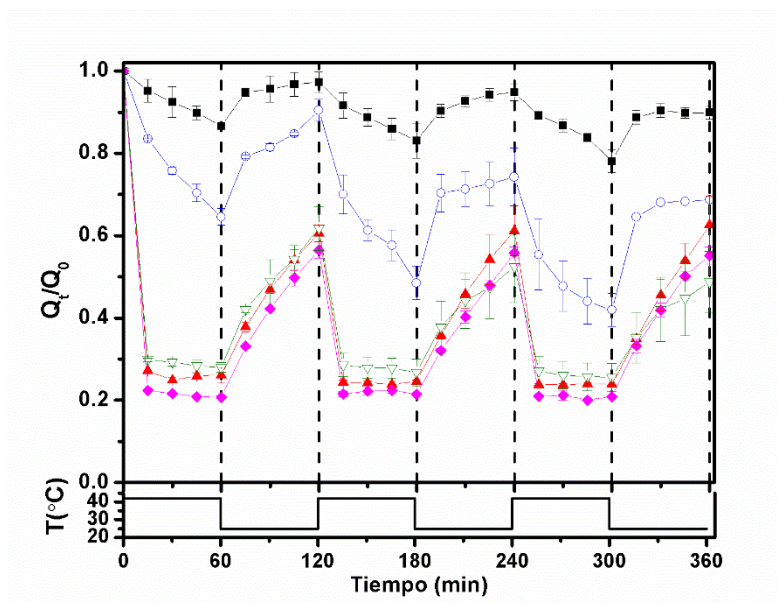


Figura 6. Proceso de hinchamiento/contracción de hidrogeles en ciclos de temperatura de 25 °C y 42 °C: (-■-) NIPAAm/MG 100:0, (-○-) NIPAAm/MG 92.5:7.5, (-▲-) 85:15 NIPAAm/MG, (-▽-) 85:15 D NIPAAm/MG, (-◆-) 70:30 NIPAAm/MG

Con los resultados obtenidos proponemos que los hidrogeles microestructurados sufren una contracción por arriba de la T_{tr} de los microgeles siendo más rápida que la del (macro) hidrogel por lo que se crean poros por los que el agua es “expulsada” por la contracción de (macro) hidrogel como se muestra en la siguiente Figura 7.

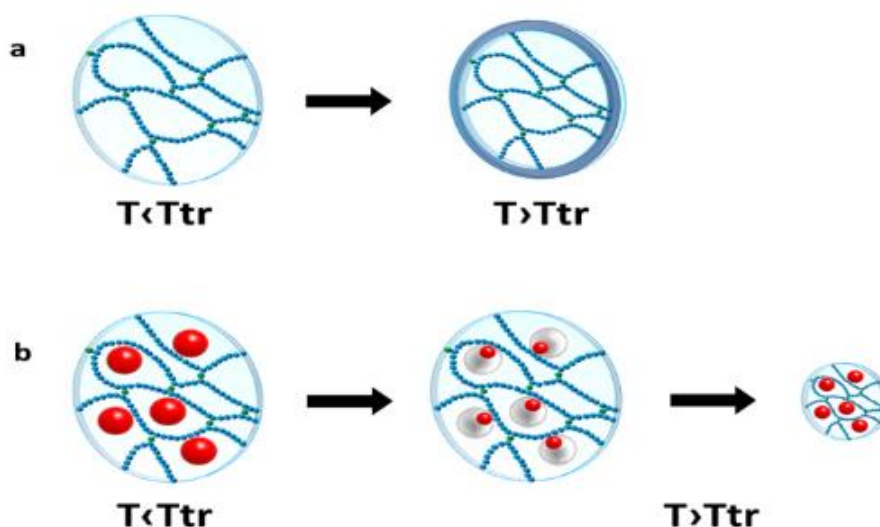


Figura 7. Representación del comportamiento teórico de los hidrogeles microestructurados de NIPAAm

Los hidrogeles fueron cargados con dos diferentes moléculas para su cargado y liberación, siendo vitamina B₁₂ y citocromo C colocándolos en ciclos de temperatura en los cuales se colocaron entre 25 °C y 40 °C.

La liberación de vitamina B₁₂ se observa en la Figura 8 una liberación considerable en la primera hora a 25 °C para todos los hidrogeles excepto para 92.5:7.5. El hidrogel NIPAAm 100:0 en el cambio de temperatura a 40 °C se observa cómo se detiene completamente la liberación durante toda la hora, sin embargo, al disminuir la temperatura a 25 °C se reinicia la liberación, lo que nos confirma la formación de una piel sobre la superficie del hidrogel bloqueando la liberación cuando se encuentra por encima de LCST. Para hidrogel de NIPAAm 70:30 a 25 °C en la primera hora se libera alrededor del 80% y no se observa ningún efecto de aumento

de la temperatura, lo cual se atribuye a la mayor capacidad de hinchamiento de este hidrogel.

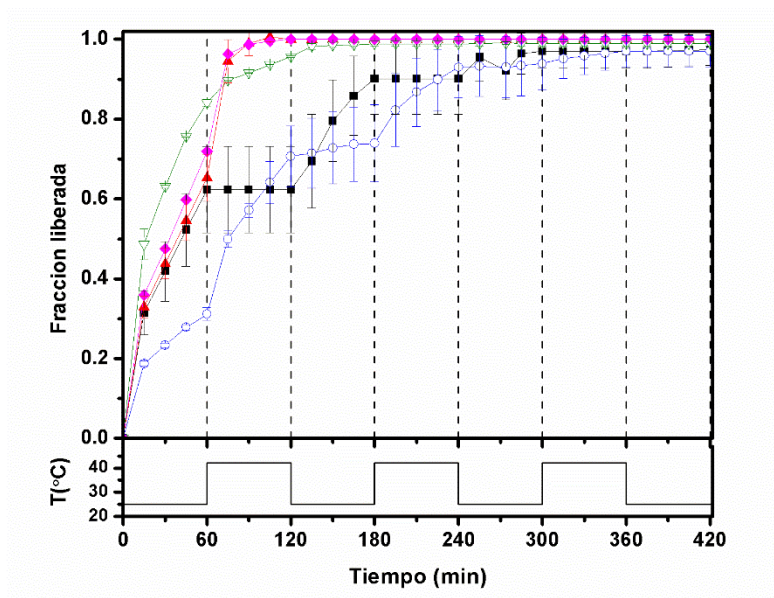


Figura 8. Liberación de vitamina B₁₂ en ciclos de temperatura de 25 °C y 42 °C: (■-) NIPAAm/MG 100:0, (-○-) NIPAAm/MG 92.5:7.5, (-▲-) 85:15 NIPAAm/MG, (-▽-) 85:15 D NIPAAm/MG, (-◆-) 70:30 NIPAAm/MG

Mientras que ambos hidrogeles NIPAAm 85:15 se comportan de la misma manera, liberando cerca del 60% a 25 °C, observándose un incremento en la velocidad de liberación cuando ocurre el cambio por encima de temperatura la LCST mostrando una liberación del 100% en el primer ciclo de temperatura. Mientras que el hidrogel 92.5:7.5 muestra una pequeña liberación a 25 °C mostrando un aumento en la velocidad de liberación cuando ocurre el cambio de temperatura a 40 °C, este comportamiento se mantiene a través de los diferentes ciclos de temperatura hasta que es alcanzado el 100% de la liberación.

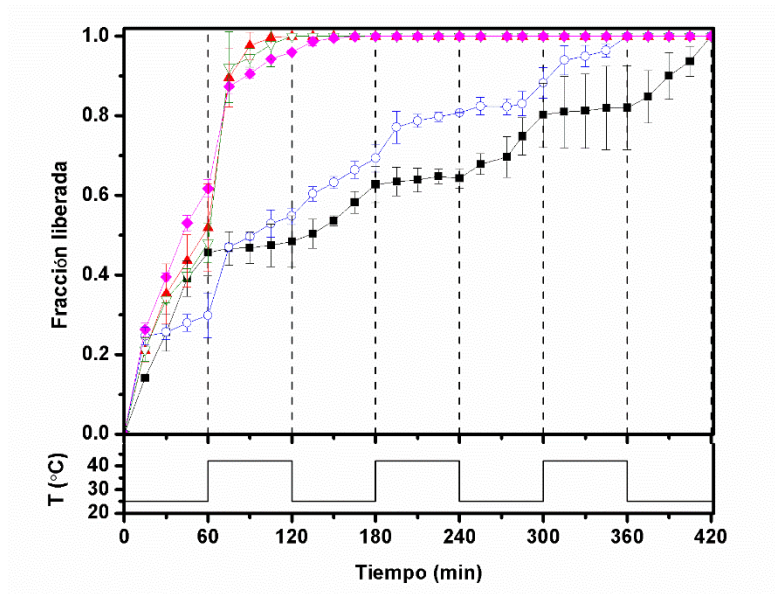


Figura 9. Liberación de citocromo C en ciclos de temperatura de 25 °C y 42 °C: (-■-) NIPAAm/MG 100:0, (-○-) NIPAAm/MG 92.5:7.5, (-▲-) 85:15 NIPAAm/MG, (-▽-) 85:15 D NIPAAm/MG, (-◆-) 70:30 NIPAAm/MG

En la liberación de citocromo C muestra en la Figura 9 que el proceso de liberación es lento en comparación de vitamina B₁₂ esto se atribuye a la diferencia de peso molecular, el hidrogel NIPAAm 100:0 repite su comportamiento ante los cambios de temperatura. Los hidrogeles NIPAAm 85:15 ambas formulaciones y 70:30 muestran un aumento significativo cuando la liberación es colocada a 40 °C alcanzado casi el 100% de la liberación. El hidrogel con mejor liberación a manera de pulsos es el hidrogel NIPAAm 92.5:7.5 en el cual se observan una liberación lenta para 25 °C y un aumento en la velocidad de liberación para los 40 °C tomando tres ciclos para su liberación completa.

III. 2 SÍNTESIS DE MICROGELES COPOLIMÉRICOS CON AJUSTE DE TEMPERATURA DE TRANSICIÓN

III.2.1 MICROGELES CON GRUPOS ÁCIDOS AMFIFILICOS

Se sintetizaron diferentes microgeles de NIPAAm los cuales se copolimerizaron con monómeros ácidos 2-MBA y 4-MBA y las sales de estos, dando un total de 4 formulaciones con 4 diferentes porcentajes.

La primera serie de microgeles obtenidas de NIPAAm con 2-MBA del cual se realizaron 4 porcentajes diferentes donde la Tabla 1 muestra el tamaño, PDI y Ttr en agua y amortiguador pH 7.4 , en los cuales muestra tamaños de 500 hasta 700 nm con un PDI menor a 0.2 lo que nos indica una buena homogeneidad de tamaño, estos son comparados con un tamaño de 580 nm de microgeles de NIPAAm 100% esto nos muestra que el monómero ácido no afecta la formación de los microgeles y el tamaño se mantiene similar, mientras que la temperatura de transición es de 34°C para todos los microgeles sin verse modificada por encima de la temperatura corporal por el contenido de ácido.

Tabla 1. Caracterización de microgeles de NIPAAm con 2-MBA en diferentes porcentajes.

Micropartículas	Tamaño (nm)	PDI	Ttr(°C) agua	Ttr (°C) 7.4
NIPAAm/2-MBA 5%	501	0.023	34	34
NIPAAm/2-MBA 10%	521	0.058	34	34
NIPAAm/2-MBA 12.5%	519	0.113	34	34
NIPAAm/2-MBA 15%	622	0.156	34	34

Como segunda serie se sintetizaron 4 tipos de microgeles de sal de 2-MBA, donde los resultados de tamaño, PDI, Ttr en agua y amortiguador pH 7.4 se observan en la Tabla 2, el tamaño de los microgeles es afectado mostrando un aumento significativo en todos los porcentajes sintetizados donde el monómero en forma ácida obtiene un promedio de 600 nm mientras que la sal muestra un tamaño entre 1200 y 1800 nm, sin embargo estos microgeles obtienen una buena distribución lo que nos indica una distribución homogénea, mientras que en la temperatura de transición esta no se ve afectada manteniendo la temperatura de 32 °C.

Tabla 2. Caracterización de microgeles de NIPAAm con sal de 2-MBA en diferentes porcentajes.

Micropartículas	Tamaño (nm)	PDI	Ttr(°C) agua	Ttr (°C) 7.4
NIPAAm/2-MBAK 5%	1852	0.235	32	32
NIPAAm/2-MBAK 10%	1463	0.206	32	32
NIPAAm/2-MBAK 12.5%	1440	0.038	32	32
NIPAAm/2-MBAK 15%	1253	0.220	32	32

La tercera sección se basa en la síntesis de microgeles NIPAAm con el ácido 4-MBA donde la Tabla 3 nos muestra que los tamaños obtenidos en los diferentes porcentajes de ácido oscilan entre 500 a 700 nm, siendo similares a las de NIPAAm con una buena distribución.

Tabla 3. Caracterización de microgeles de NIPAAm con 4-MBA en diferentes porcentajes

Micropartículas	Tamaño (nm)	PDI	Ttr(°C) agua	Ttr (°C) 7.4
NIPAAm/4-MBA 5%	687	0.130	32	30
NIPAAm/4-MBA 10%	549	0.066	32	30
NIPAAm/4-MBA 12.5%	534	0.119	32	32
NIPAAm/4-MBA 15%	544	0.110	32	30

En la cuarta sección los microgeles sintetizados fueron de sal de 4-MBA, donde se observa en la Tabla 4 una disminución significativa del tamaño de 150 a 300 nm, lo cual nos indica que la sal de potasio funciona como un tensoactivo de la reacción brindando nuevos puntos de formación de microgeles. En ambos casos la temperatura de transición no se ve afectada por estos copolímeros.

Tabla 4. Caracterización de microgeles de NIPAAm con sal de 4-MBA en diferentes porcentajes

Micropartículas	Tamaño (nm)	PDI	Ttr(°C) agua	Ttr (°C) 7.4
NIPAAm/4-MBAK 5%	356	0.155	32	34
NIPAAm/4-MBAK 10%	270	0.259	32	36
NIPAAm/4-MBAK 12.5%	130	0.281	32	36
NIPAAm/4-MBAK 15%	260	0.240	34	36

Los microgeles fueron sometidos al análisis del contenido de grupos ácidos, lo cual se observa la incorporación de los grupos ácidos con una ligera disminución de 1% a lo teóricamente propuesto.

Los microgeles fueron analizados ante diferentes soluciones amortiguadoras de pH 3, 5, 7 y 9, donde las microgeles de NIPAAm 100% se agregan en todos los pH a 32 °C pero no en agua, los microgeles de 2-MBA de manera ácida y en forma de sal en todos sus porcentajes muestran el mismo comportamiento sufriendo agregación a 32 °C y 34 °C en todas las soluciones. Mientras que los microgeles a partir de 4-MBA en forma ácida y en sal muestran un comportamiento de agregación en pH ácido siendo estos 3 y 5, mientras que en pH de 7 y 9 estas sufren un cambio en la estructura en forma de contracción.

III.2.2 MICROGELES CON GRUPOS ÁCIDOS HIDROFÍLICOS NO IONIZABLES

Los resultados de esta sección se reportan en el artículo “Microstructured hydrogels with modulated transition temperature for positive control release”, K. Palomino, J.M. Cornejo-Bravo, H. Magaña, A. Serrano-Medina, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, col. 13, 141-154 (2018) ver anexo B, se resumen los principales resultados.

Esta sección se preparó microgeles de NIPAAm con microgeles de NIPAAm 100% y los copolímeros DMA en 10, 20 y 30% y AAm en 10, 15 y 20%, los resultados de tamaño, PDI, rendimiento y temperatura de transición se muestran en la Tabla 5.

Los microgeles que contienen DMA son más pequeñas y entre mayor sea el porcentaje de DMA su tamaño disminuye, sin embargo, no logran un aumento significativo de la temperatura de transición llegando a un máximo de los 36 °C,

mientras que los microgeles de AAm aumenta su tamaño conforme aumenta el monómero ácido en todos los casos superior a las de NIPAAm, pero estos microgeles logran un ajuste de temperatura de transición mayor que la corporal, siendo de 38 °C en 10% y 15%, y de 40 °C para 20% los cuales concuerdan con lo reportado en la literatura.

Tabla 5. Caracterización de microgeles de NIPAAm con grupos ácidos hidrofílicos no ionizables

Micropartículas	Tamaño (nm)	PDI	Rendimiento (% peso)	Ttr (°C)
NIPAAm	579	0.078	71	32
NIPAAm/DMA (90:10)	497	0.111	80	34
NIPAAm/DMA (80:20)	363	0.085	86	34
NIPAAm/DMA (70:30)	360	0.013	86	36
NIPAAm/AAm (90:10)	610	0.172	70	38
NIPAAm/AAm (85:15)	765	0.196	73	38
NIPAAm/AAm (80:20)	804	0.443	68	40

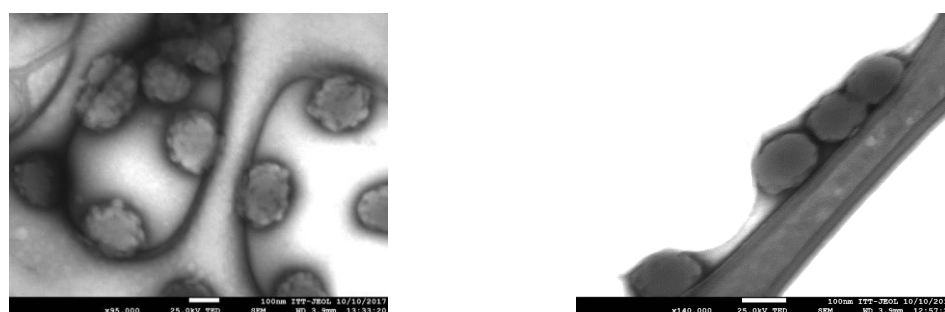


Figura 10. Microscopias de STEM de a) NIPAAm/AAm y b) NIPAAm/DMA en proporción del 10%.

La Figura 10 presenta imágenes STEM corroborando las dimensiones obtenidas por DLS de los microgeles siendo a) NIPAAm/AAm (90:10) y b) NIPAAm/DMA (90:10).

III.3 HIDROGELES MICROESTRUCTURADOS CON AJUSTE DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN

Dados los resultados en la sección anterior en el cual se logró incrementar la temperatura de transición únicamente para los microgeles que contienen copolímeros hidrofílicos, con estos resultados se procedió a preparar hidrogeles microestructurados con los microgeles con ajuste de temperatura. Los resultados de esta sección se reportaron en el artículo “Microstructured hydrogels with modulated transition temperature for positive control release”, K. Palomino, J.M. Cornejo-Bravo, H. Magaña, A. Serrano-Medina, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, col. 13, 141-154 (2018) ver anexo B, se resumen los resultados más relevantes.

Los hidrogeles se sintetizaron de la misma manera anteriormente mencionada, los cuales se utilizó NIPAAm y se copolimerizo con DMA y AAm en 10 y 20%, a los cuales se estudió su Ttr mediante el grado de hinchamiento en temperatura de 20 °C a 50 °C, estos datos se analizaron y se obtuvo la Ttr por medio del punto de cambio máximo los cuales se muestran en la Tabla 6, para los hidrogeles copoliméricos DMA 10% tienen una transición a 36 °C mientras que el hidrogel con DMA 20% presentando una caída en el tamaño a 42 °C. Por otro lado, los de AAm

10 y 20 % muestran una transición de hinchamiento continuo sin un punto de inflexión claro. La transición continua carece de un valor crítico claro, es un fenómeno atribuido a la heterogeneidad en la composición de los hidrogeles[42]. En tal caso, Ttr se define como la temperatura a la que los hidrogeles se contraen a la mitad de su contracción máxima. Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura[43].

Tabla 6. Temperatura de transición de los hidrogeles microestructurados

Hidrogeles	Ttr (°C)
NIPAAm	32
NIPAAm/DMA (90:10)	36
NIPAAm/DMA (80:20)	42
NIPAAm/AAm (90:10)	36
NIPAAm/AAm (80:20)	36

Con los datos obtenidos en los experimentos anteriores se decidió utilizar el hidrogel NIPAAm/DMA (80:20) como la composición del hidrogel a estudiar y con este preparar hidrogeles que contienen 15% de microgeles de NIPAAm 100%, 15 y 30% de microgeles de dos composiciones NIPAAm/AAm 15 y 20%. En la Figura 11 se muestra las microscopias de dos hidrogeles NIPAAm/DMA (80:20) y NIPAAm/DMA (80:20) con 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) donde el hidrogel convencional se observa como un material no poroso mientras que el hidrogel microestructurado se observa poroso.

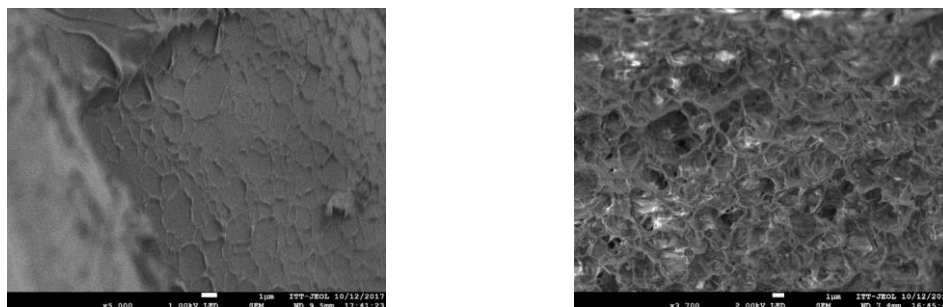


Figura 11. Imágenes de SEM de hidrogeles a) NIPAAm/DMA (20%) y b) NIPAAm/DMA (80:20) CON 30%MG NIPAAm/AAm (80:20)

La Figura 12 muestra la cinética de hinchamiento de las diferentes formulaciones estudiadas, mostrando que el equilibrio se alcanza en 200 min. En general los hidrogeles microestructurados presentan un hinchamiento más rápido y una mayor capacidad de hinchamiento, lo cual se le puede atribuir a las heterogeneidades producto de los microgeles mostrando el mayor hinchamiento en los que contienen 30%.

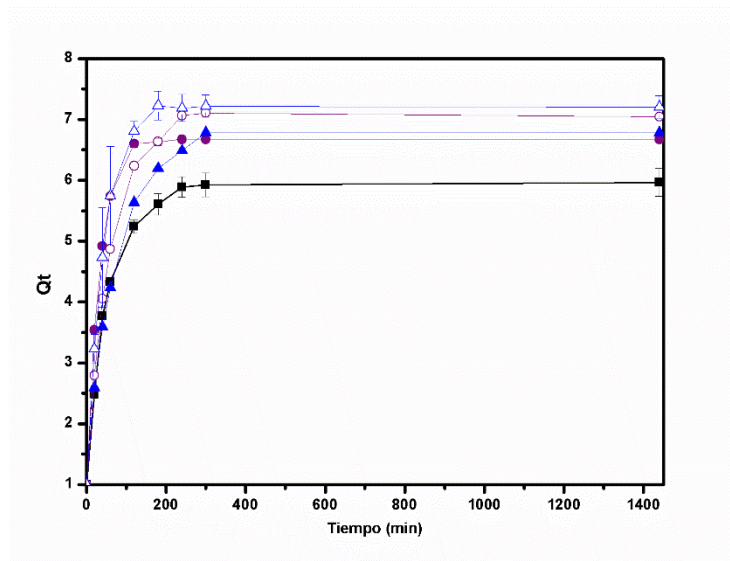


Figura 12. Grado de hinchamiento de hidrogeles microestructurados de NIPAAm/DMA (80:20) con: (-■-) 15% MG NIPAAm, (-●-) 15% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-▲-) 15% MG NIPAAm/AAm (80:20), (-○-) 30% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-△-) 30% MG NIPAAm/AAm (80:20).

La cinética de contracción se determinó en dos experimentos diferentes. En el primero, los hidrogeles se hincharon en equilibrio a 25 °C y luego se colocaron a 42 °C. La Figura 13 muestra los hidrogeles microestructurados tienen una respuesta rápida que alcanza una retención mínima de agua en el primer muestreo a los 10 min. La mayor contracción se observa en el hidrogel que contiene microgeles de NIPAAm, siguiendo la tendencia los que contienen microgeles con menor proporción de AAm.

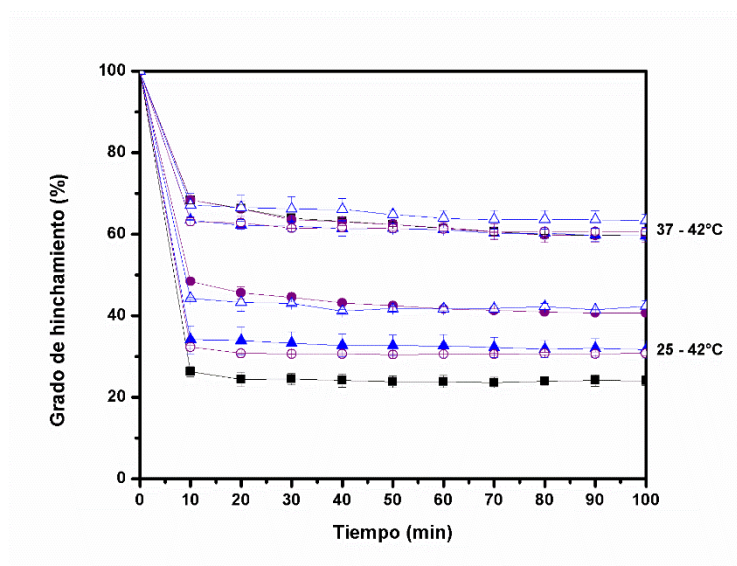
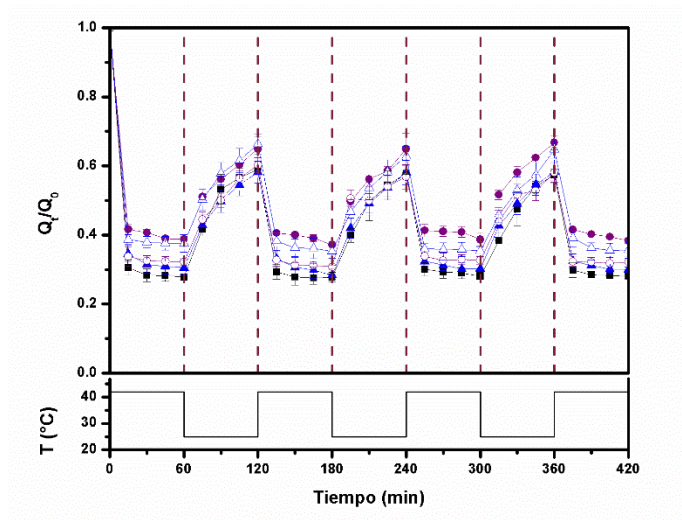


Figura 13. Proceso de contracción de hidrogeles microestructurados de NIPAAm/DMA (80:20) con: (-■-) 15% MG NIPAAm, (-●-) 15% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-▲-) 15% MG NIPAAm/AAm (80:20), (-○-) 30% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-△-) 30% MG NIPAAm/AAm (80:20).

El segundo estudio se realizó a partir de una temperatura de 37 °C en equilibrio y se procedió al cambio a 42 °C, donde observamos que a los hidrogeles tienen una menor capacidad de contracción, esto debido a la continuidad de la transición, en la

que se produce una contracción considerable de los hidrogeles a 37 °C, y por ello disminuye la diferencia en el contenido de agua en los hidrogeles entre ambas temperaturas.

a)



b)

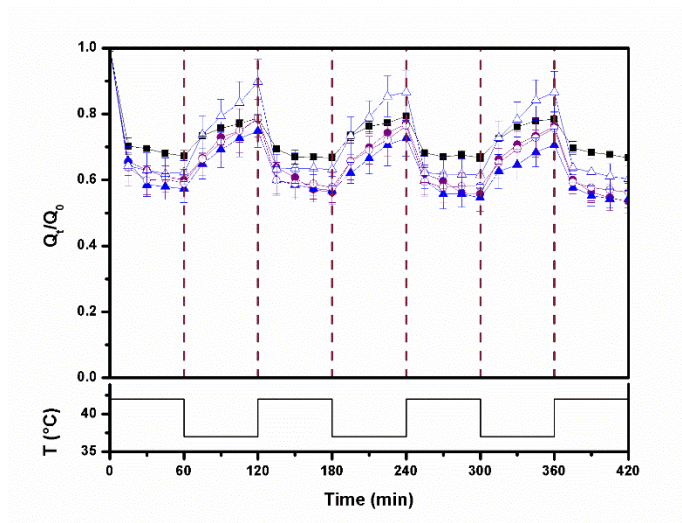


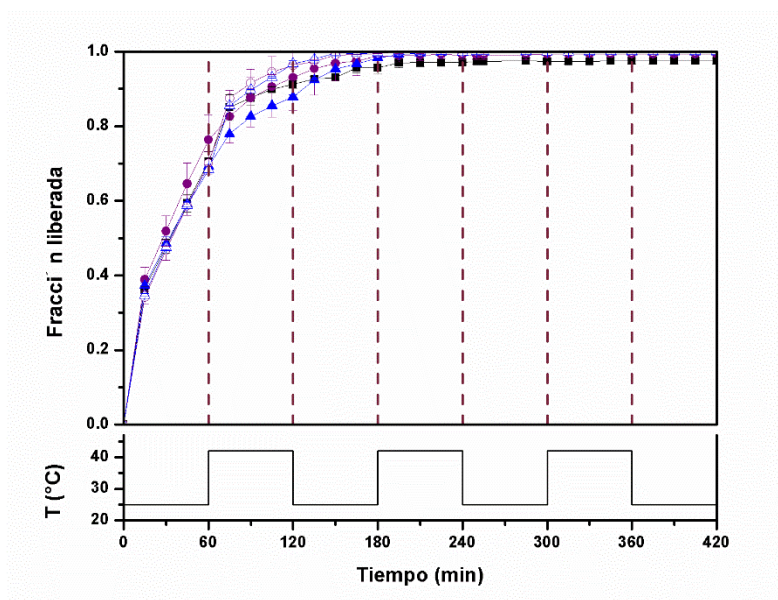
Figura 14. Proceso de hinchamiento/contracción de hidrogeles microestructurados de NIPAAm/DMA (80:20) con: (-■-) 15% MG NIPAAm, (-●-) 15% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-▲-) 15% MG NIPAAm/AAm (80:20), (-○-) 30% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-△-) 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) en ciclos de temperatura a) 25 °C y 42 °C y b) 37 °C y 42 °C.

El estudio de hinchamiento/contracción se realizó en los dos ciclos de temperatura de 25 °C a 42 °C (Figura 14 a) y 37 °C a 42 °C (Figura 14 b). En estas gráficas observamos que los hidrogeles microestructurados tienen contracción rápida y reversible en ambos casos. En el estudio con ciclos de 25 °C y 42 °C se aprecia una diferencia de aproximadamente 30% en la retención de agua entre el estado hinchado y contraído, mientras que en el ciclo de temperaturas de 37 °C y 42 °C muestra un menor porcentaje de retención de agua siendo este de solamente 15% entre el estado hinchado y contraído, esta diferencia de retención de agua se debe a la continuidad de las curvas Q vs temperatura.

Se realizó el cargado de los hidrogeles microestructurados con macromoléculas siendo vitamina B₁₂ y citocromo C, donde se observó la captura en mayor cantidad de citocromo C el cual es el de mayor peso molecular.

El estudio de liberación de vitamina B₁₂ se realizó en ciclos de temperatura los anteriormente mencionados (Figura 15). En el ciclo de temperatura de 25 °C y 42 °C muestra que aproximadamente el 70% fue liberado en la primera hora a 25 °C en todos los hidrogeles, estos a su vez muestran un pequeño aumento de la velocidad a 42 °C en mayor intensidad para los microestructurados con un 30% de microgeles, todos los hidrogeles muestran una liberación casi completa en el primer ciclo de temperatura.

a)



b)

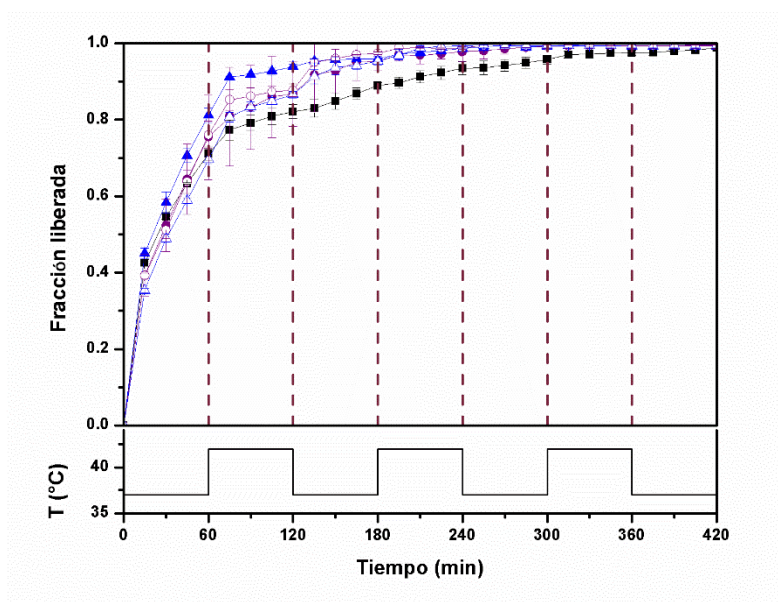


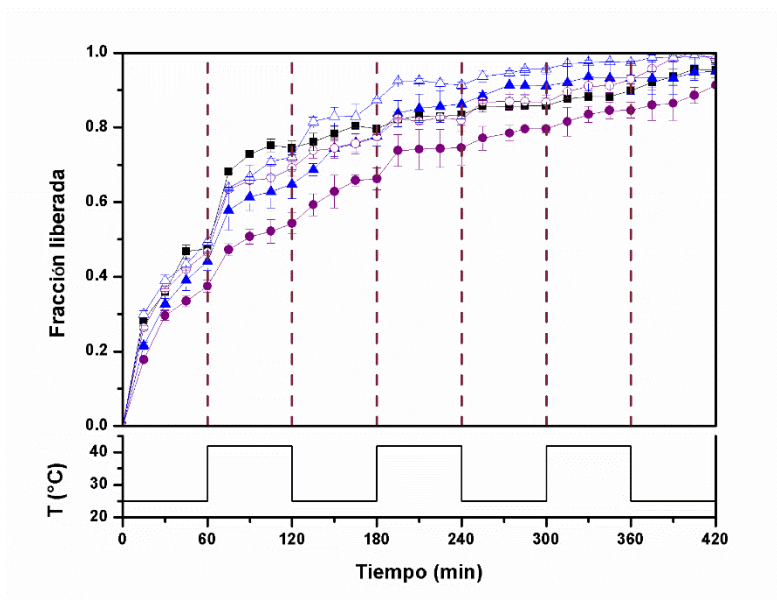
Figura 15. Liberación de vitamina B₁₂ en hidrogeles microestructurados de NIPAAm/DMA (80:20) con: (-■-) 15% MG NIPAAm, (-●-) 15% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-▲-) 15% MG NIPAAm/AAm (80:20), (-○-) 30% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-△-) 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) en ciclos de temperatura, a) 25 °C y 42 °C y b) 37 °C y 42 °C

El estudio realizado en los ciclos de temperatura de 37 °C y 42 °C es similar a los resultados anteriores donde la mayor cantidad de vitamina B₁₂ es liberada en el primer ciclo de temperatura a 37 °C sin mostrar una aceleración en el cambio a 42°C. Mientras que la liberación más lenta la tiene el hidrogel microestructurado que contiene 15% microgeles de NIPAAm 100% le toma 3 ciclos de temperatura para alcanzar el 100% de liberación.

La liberación con citocromo C se realiza de igual manera en dos experimentos los resultados se muestran en la Figura 16 a donde se observa una liberación de alrededor del 40% en la primera hora de muestreo a 25 °C, sin embargo, la velocidad de liberación aumenta con el cambio de temperatura a 42 °C, esto significa que la velocidad de liberación se ve aumentada cuando los hidrogeles sufren una contracción y “expulsan” el agua. El hidrogel con la mejor liberación controlada por temperatura es el que contiene un 15% de microgeles NIPAAm/AAm (85:15).

La Figura 16 b nos muestra la liberación de citocromo C en ciclos de temperatura de 37 °C y 42 °C, donde los hidrogeles con 15% MP NIPAAm 100% muestra una liberación rápida alcanzando el 70% en la primera hora a 37 °C, en este caso los microgeles se encuentran contraídos mientras que el hidrogel se encuentra parcialmente hinchado, lo que explica la rápida liberación del contenido a través de los poros creados por la contracción de los MG.

a)



b)

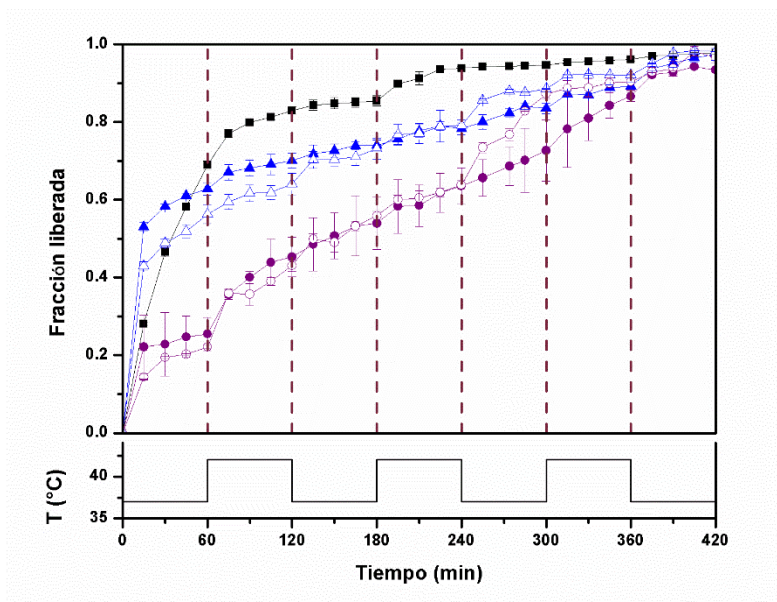


Figura 16. Liberación de citocromo C en hidrogel microestructurados de NIPAAm/DMA (80:20) con: (-■-) 15% MG NIPAAm, (-●-) 15% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-▲-) 15% MG NIPAAm/AAm (80:20), (-○-) 30% MG NIPAAm/AAm (85:15), (-△-) 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) en ciclos de temperatura, a) 25 °C y 42 °C y b) 37 °C y 42 °C

Los hidrogeles con 15 y 30% microgeles de NIPAAm/AAm (80:20) nos muestra una liberación alta cercana al 60% en la primera hora y estando a 37 °C, manteniendo una liberación continua a lo largo de los ciclos independiente de la temperatura. Los hidrogeles de 15 y 30% microgeles de NIPAAm/AAm (85:15) muestran una liberación de solo el 20% en la primera hora a 37 °C, en esta temperatura las microgeles se encuentran hinchadas y esto bloquean la difusión del citocromo C. El hidrogel con 30% de microgeles aumenta la velocidad de liberación cuando se encuentra a 42 °C, lo que indica una liberación de control positiva para al menos dos ciclos de temperatura. El resto de los hidrogeles muestran una liberación continua y todos los hidrogeles necesitan los 3 ciclos para liberar el total del contenido.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La integración de microgeles de NIPAAm en los hidrogeles de NIPAAm produce una rápida respuesta térmica en los materiales y mejora las propiedades mecánicas. Los hidrogeles microestructurados muestran una capacidad de hinchamiento similar a los hidrogeles sin MG, sin embargo, la contracción de los hidrogeles microestructurados es rápida la cual se atribuye a que por encima del LCST se forman microporos por la contracción de MG, antes que el hidrogel permitiendo que este expulse agua y evitando la formación de una piel en la superficie, ya que los hidrogeles de NIPAAm presentan este problema de formación de piel, la cual bloquea la contracción y liberación del contenido. Mientras que los hidrogeles microestructurados presentan un control positivo en la liberación del fármaco. La liberación pulsátil controlada por temperatura se puede obtener cuando se incluye una pequeña proporción de MG en los hidrogeles, de lo contrario, la liberación es demasiado rápida para un sistema de liberación controlada.

En la continuación del estudio se logró demostrar que es posible modular la T_{tr} de hidrogeles microestructurados basados en NIPAAm, por encima de la temperatura corporal, mediante la copolimerización con DMA o AAm. Los hidrogeles muestran una respuesta rápida de 37 °C a 42 °C, sin embargo, muestran una contracción considerable a 37 °C, mostrando un menor cambio en el hinchamiento comparado con el ciclo de 25 °C a 42 °C. Los estudios de liberación muestran una liberación rápida de solutos de bajo peso molecular (vitamina B₁₂), sin control de temperatura para los hidrogeles microestructurados estudiados. Por otro lado, existe algún

control de temperatura para la liberación de moléculas de mayor peso molecular (citocromo C) con los hidrogeles que contienen MG con Ttr por arriba de 37 °C.

Los resultados indican que, incluso cuando se puede obtener algún control de la liberación, todavía existe la necesidad de desarrollar materiales con una transición discontinua hinchada - no hinchada por encima de la temperatura corporal normal para aplicaciones en la liberación de control positivo de macromoléculas sensible a la temperatura. El método utilizado es fácil y escalable para producir materiales con respuesta de temperatura rápida y propiedades mecánicas mejoradas, utilizando medios acuosos para la polimerización siendo un proceso amigable con medio ambiente.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

- [1] J.K. Oh, R. Drumright, D.J. Siegwart, K. Matyjaszewski, The development of microgels/nanogels for drug delivery applications, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 448–477. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.01.002.
- [2] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 75 (2010) 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- [3] S. Bhattacharya, F. Eckert, V. Boyko, A. Pich, Temperature-, pH-, and magnetic-field-sensitive hybrid microgels, *Small*. 3 (2007) 650–657. doi:10.1002/sml.200600590.
- [4] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, X.J. Liang, PH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 693–710. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.009.
- [5] X. Pang, Y. Jiang, Q. Xiao, A.W. Leung, H. Hua, C. Xu, PH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress, *J. Control. Release*. 222 (2016) 116–129. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.024.
- [6] M. Zrinyi, Intelligent polymer gels controlled by magnetic fields, *Colloid Polym. Sci.* 278 (2000) 98–103. doi:10.1007/s003960050017.
- [7] R. Almaraz, M. Cruz, Síntesis, caracterización y aplicación del PS entrecruzado a partir de residuos de PS, *Rev. Iberoam. Polímeros*. 8 (2007) 112–137. <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/MAR07/leon.pdf>.
- [8] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 18–23. doi:10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [9] L. Weng, A. Gouldstone, Y. Wu, W. Chen, Mechanically strong double network photocrosslinked hydrogels from N,N-dimethylacrylamide and glycidyl methacrylated hyaluronan, *Biomaterials*. 29 (2008) 2153–2163. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.012.
- [10] A. Navaei, D. Truong, J. Heffernan, J. Cutts, D. Brafman, R.W. Sirianni, B. Vernon, M. Nikkhah, PNIPAAm-based biohybrid injectable hydrogel for cardiac tissue engineering, *Acta Biomater.* 32 (2016) 10–23. doi:10.1016/j.actbio.2015.12.019.
- [11] M. Radecki, J. Spěváček, A. Zhigunov, Z. Sedláková, L. Hanyková, Temperature-induced phase transition in hydrogels of interpenetrating networks of poly(N-isopropylacrylamide) and polyacrylamide, *Eur. Polym. J.* 68 (2015) 68–79. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.04.019.
- [12] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *Eur. Polym. J.* 65 (2015) 252–267. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [13] M.A. Haque, T. Kurokawa, J.P. Gong, Super tough double network hydrogels and their application as biomaterials, *Polymer (Guildf)*. 53 (2012) 1805–1822. doi:10.1016/j.polymer.2012.03.013.
- [14] E.S. Dragan, Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review, *Chem. Eng. J.* 243 (2014) 572–590. doi:10.1016/j.cej.2014.01.065.
- [15] L. Klouda, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015).

- doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.017.
- [16] Y. Hirokawa, T. Tanaka, Volume phase transition in a noionic gel, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 6379–6380. doi:10.1063/1.34300.
 - [17] Y. Yu, Y. Liu, Y. Kong, E. Zhang, F. Jia, S. Li, Synthesis and Characterization of Temperature-Sensitive Poly(N-isopropylacryamide) Hydrogel with Comonomer and Semi-IPN material, *Polym. - Plast. Technol. Eng.* 51 (2012) 854–860. doi:10.1080/03602559.2012.671419.
 - [18] A. Gutowska, Y.H. Bae, H. Jacobs, F. Mohammad, D. Mix, J. Feijen, S.W. Kim, Heparin release from thermosensitive polymer coatings: in vivo studies, *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 811–821. doi:10.1002/jbm.820290705.
 - [19] J.-T. Zhang, S.-X. Cheng, S.-W. Huang, R.-X. Zhuo, Temperature-Sensitive Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels with Macroporous Structure and Fast Response Rate, *Macromol. Rapid Commun.* 24 (2003) 447–451. doi:10.1002/marc.200390061.
 - [20] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *J. Control. Release.* 190 (2014) 254–273. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.052.
 - [21] S. Belali, A.R. Karimi, M. Hadizadeh, Novel nanostructured smart, photodynamic hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide) bearing porphyrin units in their crosslink chains: A potential sensitizer system in cancer therapy, *Polymer (Guildf).* 109 (2017) 93–105. doi:10.1016/j.polymer.2016.12.041.
 - [22] L. Klouda, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 338–349. doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.017.
 - [23] G. Fundueanu, M. Constantin, S. Bucatariu, P. Ascenzi, pH/thermo-responsive poly (N-isopropylacrylamide-co-maleic acid) hydrogel with a sensor and an actuator for biomedical applications, *Polymer (Guildf).* (2017). doi:10.1016/j.polymer.2017.01.003.
 - [24] A.M. Ponce, Z. Vujaskovic, F. Yuan, D. Needham, M.W. Dewhirst, Hyperthermia mediated liposomal drug delivery, *Int. J. Hyperth.* 22 (2006) 205–213. doi:10.1080/02656730600582956.
 - [25] W. Xiong, W. Wang, Y. Wang, Y. Zhao, H. Chen, H. Xu, X. Yang, Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 84 (2011) 447–453. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.01.040.
 - [26] K. Yasuda, J.P. Gong, Y. Katsuyama, A. Nakayama, Y. Tanabe, E. Kondo, M. Ueno, Y. Osada, Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels, *Biomaterials.* 26 (2005) 4468–4475. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.021.
 - [27] K. Haraguchi, H.-J. Li, Y. Xu, G. Li, Copolymer nanocomposite hydrogels: Unique tensile mechanical properties and network structures, *Polymer (Guildf).* 96 (2016) 94–103. doi:10.1016/j.polymer.2016.04.039.
 - [28] X. Zhang, D. Wu, C.C. Chu, Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH sensitive Dex-MA/PNIPAAm hydrogels,

- Biomaterials. 25 (2004) 4719–4730. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.11.040.
- [29] J.A. Hulse, S.M. Rosenthal, L. Cuttler, S.L. Kaplan, M.M. Grumbach, The effect of pulsatile administration, continuous infusion, and diurnal variation on the growth hormone (gh) response to gh-releasing hormone in normal men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (1986) 872–878. doi:10.1210/jcem-63-4-872.
 - [30] C.S. Tam, J.N.M. Heersche, T.M. Murray, J.A. Parsons, Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: Differential effects of intermittent and continuous administration, *Endocrinology.* 110 (1982) 506–512. doi:10.1210/endo-110-2-506.
 - [31] P. Belchetz, T. Plant, Y. Nakai, E. Keogh, E. Knobil, Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone, *Science* (80-.). 202 (1978) 631–633. doi:10.1126/science.100883.
 - [32] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1–9. doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.001.
 - [33] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems., *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010) 217–23. doi:10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
 - [34] R. Singh, J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 215–223. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
 - [35] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E.J. Suuronen, Z. Zhong, Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials.* 35 (2014) 4969–4985. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.001.
 - [36] K. Palomino, K.A. Suarez-Meraz, A. Serrano-Medina, A. Olivas, E.C. Samano, J.M. Cornejo-Bravo, Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery, *J. Polym. Res.* 22 (2015). doi:10.1007/s10965-015-0841-0.
 - [37] H. Wei, X.Z. Zhang, H. Cheng, W.Q. Chen, S.X. Cheng, R.X. Zhuo, Self-assembled thermo- and pH responsive micelles of poly(10-undecenoic acid-b-N-isopropylacrylamide) for drug delivery, *J. Control. Release.* 116 (2006) 266–274. doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.018.
 - [38] W. Xue, I.W. Hamley, M.B. Huglin, Rapid swelling and deswelling of thermoreversible hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels prepared by freezing polymerisation, *Polymer (Guildf).* 43 (2002) 5181–5186. doi:10.1016/S0032-3861(02)00396-8.
 - [39] S. Tang, R. Bhandari, S.P. Delaney, E.J. Munson, T.D. Dziubla, J.Z. Hilt, Synthesis and characterization of thermally responsive N-isopropylacrylamide hydrogels copolymerized with novel hydrophobic polyphenolic crosslinkers, *Mater. Today Commun.* 10 (2017) 46–53. doi:10.1016/j.mtcomm.2016.12.003.
 - [40] S.-X. Cheng, J.-T. Zhang, R.-X. Zhuo, Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved protein release properties., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 67 (2003) 96–103. doi:10.1002/jbm.a.10062.
 - [41] FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014.

doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

- [42] S. Zhou, B. Chu, Synthesis and Volume Phase Transition of Poly(methacrylic acid- co - N -isopropylacrylamide) Microgel Particles in Water, J. Phys. Chem. B. 102 (1998) 1364–1371. doi:10.1021/jp972990p.
- [43] M. Shibayama, M. Shibayama, S. Mizutani, S. Mizutani, S. Nomura, S. Nomura, Thermal Properties of Copolymer Gels Containing, Macromolecules. 29 (1996) 2019–2024. doi:10.1021/ma951390q.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo A: Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery

Authors: K. Palomino, K.A. Suarez-Meraz, A. Serrano-Medina, A. Olivas, E.C. Samano and J.M. Cornejo-Bravo

Article: Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery

Journal: Journal of Polymer Research

Volume: 22

Year: 2015

Pages: 199-207

ISSN: 10229760

Microstructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery

K. Palomino¹ · K. A. Suarez-Meraz¹ · A. Serrano-Medina¹ · A. Olivas² ·
E. C. Samano² · J. M. Cornejo-Bravo¹

Received: 21 May 2015 / Accepted: 11 September 2015 / Published online: 24 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Microstructured, temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels were prepared with different proportions of poly(N-isopropylacrylamide) microparticles. The materials presented fast shrinkage at a temperature above their transition temperature (LCST=32 °C), with highly reproducible swelling/shrinking cycles when temperature oscillates between below and above the LCST. They showed positive solute release control as a function of the temperature when small amount of microparticles were included in the hydrogels, making these hydrogels suitable for temperature controlled pulsatile drug release. The degree of crosslinking had a smaller impact than the percentage of microparticles in swelling and drug release in response to temperature. The inclusion of a small proportion of microparticles improved the mechanical properties of the hydrogels. In addition, the polymerization steps are carried on in aqueous media, being a facile, scalable, and environmentally friendly technology.

Keywords Hydrogels · p-NIPAAm · Drug delivery · Microparticles

Introduction

Materials that respond to external stimuli are called “smart materials”. Hydrogels belong to these types of materials because their degree of swelling, for instance, can be modified in response to external stimuli such as temperature, pH, ionic strength, and voltage [1].

One of most studied thermoresponsive materials is Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) that exhibits a temperature induced volume phase transition, from a swollen phase to a contracted phase, at a low critical solution temperature (LCST) of 32 °C [2, 3]. Because of this property, PNIPAAm hydrogels have applications in drug delivery [4–6], separation processes [7], and thermoresponsive gates [8], among others.

In particular, protein and peptide therapeutics produce better pharmacodynamic responses when administrated in pulses to avoid down regulation control [9–14]. In this paper, we propose the use of pulsatile drug delivery based on environmentally sensitive hydrogels since swelling controlled release can be modulated to respond to changes in the environment (e.g., temperature, pH) produced by diseases, circadian cycles, or externally induced factors [15–17]. However, hydrogels suffer from certain limitations such as slow response rates [18] and poor mechanical properties [19]. In particular, PNIPAAm hydrogels undergo vitrification during the shrinking process above the LCST. A dense “skin” layer on the surface of these hydrogels is formed that it inhibits water loss from within [20].

Most strategies to produce fast responding hydrogels are based on the production of micropores in the hydrogels through which water and solutes are expelled during hydrogel shrinkage [20–28]. Microporous structures are spongy and have low mechanical strength, thus solute release is not very reliable due to possible rupture of the hydrogel matrix during application [26].

✉ J. M. Cornejo-Bravo
jmcornejo@uabc.edu.mx

¹ Universidad Autónoma de Baja California, Calzada Universidad 14418 Parque Industrial Internacional, Tijuana, Baja California 22300, Mexico

² Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada C.P., 22860 Ensenada, B.C., Mexico

In this work, we prepared hydrogels of PNIPAAm with different proportions of PNIPAAm microparticles (MP) having a hydrodynamic diameter of 585 nm. Even though these hydrogels are not microporous, they show fast shrinking. We suggest that the fast shrinkage occurs because micropores are produced due to fast contraction of the microgels when the temperature rises above LCST. This fast mechanism allows water ejection during (macro)hydrogel shrinkage, and reversible swelling/shrinking when temperature oscillates between 25 and 40 °C. The mechanical properties of the hydrogels are also improved showing an increase in the reduced elastic modulus as the percentage of microparticles inclusion rises. These properties make these materials suitable for temperature controlled pulsatile drug delivery. Regarding this issue, the release of vitamin B₁₂ and cytochrome C loaded into the microstructured hydrogels are investigated in the LCST range.

Experimental

Materials

NIPAAm (TCI, 98 %) was recrystallized from n-hexane. N, N-methylenebisacrylamide (BIS) (Aldrich, 98 %), ammonium persulfate (APS) (Aldrich, 98 %), N, N, N, N tetramethylethylenediamine (TEMED) (Aldrich, 99.5 %), cytochrome C (Sigma-Aldrich), and vitamin B₁₂ (Sigma Aldrich) were used as received. Ethyleneglycoldimethylacrylate (EGDMA) (Aldrich, 98 %) was purified by passing the monomer through an inhibitor remover resin (Aldrich). Distilled water was put through a filter with a 0.22 µm pore size to eliminate any particulate matter before using it.

Synthesis of microparticles

MPs were prepared by dispersion polymerization [29, 30]: 0.5 g of NIPAAm and 0.043 g of EGDMA were added to 50.0 mL of distilled water. The solution was stirred for 30 min while being purged in argon to remove oxygen. The solution was heated to 85 °C in an oil bath for 30 min, and then 0.04 g of APS dissolved in 0.8 mL of distilled water was added to start the reaction. Stirring was maintained at 300 rpm. The reaction was run for 45 min and stopped by placing the reaction vessel in water/ice bath. The resulting dispersions were purified for 5 days by dialysis using a regenerated cellulose membrane with a 14 kDa molecular weight cutoff (Spectrum Laboratories). MPs were recovered by freeze drying.

Microparticles characterization

The purified (dialyzed and freeze-dried) MPs were redispersed in distilled water (1.0 mg/mL). The hydrodynamic diameter (Dh) was measured by dynamic light scattering

(DLS) using a Zetasizer Nano NS (DTS 1060; Malvern Instruments, Miami, FL, USA) equipped with a green laser of 532 nm. The angle of measurement was 173° (backscattering). The size distribution reported is the distribution by intensity. The effect of the temperature on the particle size of the MP was studied by DLS using the same Zetasizer Nano equipment by a temperature trend method from 20 to 50 °C every 2 °C.

Synthesis of PNIPAAm hydrogels

In the second stage of the polymerization, hydrogels were prepared with different weight ratios of NIPAAm to MP (NIPAAm/MP 100/0, 92.5/7.5, 85/15, and 70/30), crosslinked by BIS at 4.5 w%. The recipe used was as follows: 1.58 g of NIPAAm + MPs were dispersed in 7.92 g of distilled water, followed by 0.072 g BIS, and stirred for 15 min. Then, 1.03 mL of APS 0.15 M and 1.03 mL of TEMED 0.15 M were added to the mixture. The solution was placed between two glass plates, previously silanized. The polymerization of hydrogels was carried out at 4 °C for 24 h. A hydrogel was prepared with double proportion of cross-linked (9 w%) (NIPAAm/MP 85/15 DC). Finally, the hydrogels were cut into discs of 1 cm in diameter with a lab puncher. The hydrogels were washed with distilled water at room temperature for 5 days.

Characterization of hydrogels

Scanning electron microscopy of hydrogels

The structure and morphology of the samples were studied by a scanning electron microscope (Hitachi-X650). Hydrogels were swollen to equilibrium at 25 °C, frozen in liquid nitrogen, and freeze-dried afterwards. Next, the hydrogel samples were broken and coated with gold for visualization by an electron beam.

Determination of equilibrium swelling ratio

The equilibrium swelling degree, Q, was determined as function of temperature. Q is given by:

$$Q = (W_s - W_d) / W_d \quad (1)$$

where W_s is the weight of a hydrogel swollen to equilibrium at a given temperature, and W_d is that of the dry gel. The W_s values were obtained by weighing a hydrogel after blotting the excess of superficial water with filter paper at the 20 to 40 °C temperature range and recorded until samples reached constant weight. The LCST is determined as the maximum change in weight with temperature.

Swelling kinetics study

The kinetics of swelling of the hydrogels was measured gravimetrically at 25 °C (below the LCST) recording the weight during swelling at different times. Q_t is given by:

$$Q_t = (W_t - W_d) / W_d \quad (2)$$

where W_t is the weight at the sampling time, and W_d is defined as before.

Shrinking kinetics

The shrinking kinetics of the hydrogels was measured gravimetrically at 40 °C (above the LCST). Before the shrinking measurements, the gels were swollen to equilibrium weight in distilled water at 25 °C. Then they were immersed into distilled water at 40 °C, recording the weight during collapsing at different times. Water retention is defined as follows:

$$\text{Water Retention} = 100 \times (W_t - W_d) / W_s \quad (3)$$

where W_t is the weight of the hydrogel at the sampling time, the other symbols are the same as above.

Oscillating shrinking-swelling kinetics

The hydrogel discs were swollen to equilibrium in distilled water at 25 °C, and then the temperature was cycled between 40 and 25 °C every hour with constant agitation. The hydrogels were weighted every 15 min.

Mechanical properties of the hydrogels

The mechanical properties of the hydrogel discs were measured using a TriboScope nanoindenter, Hysitron. The nanoindenter is used in conjunction with an atomic force microscope (AFM) so that the sampling area can be visualized with the same probe before and after every indentation. The probe is a commercial Berkovich diamond tip attached to a transducer. This unit replaces the conventional optical head with a cantilever of a commercial AFM. The tip penetrates into the sample from zero up to a maximum predetermined force (loading region); then the tip returns to its original position (unloading region). The Young's modulus of the samples was found from the unloading region of the indentation curve using the Oliver and Pharr theory [31].

Loaded and release of model substances into hydrogels

Model substances were loaded by swelling the hydrogels in a phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 mg/mL vitamin B₁₂ or cytochrome C at 4 °C for 7 days. Before the release experiments, the loading solutions containing the hydrogels were

equilibrated at 25 °C. Afterwards, the loaded hydrogels were placed in 3 mL buffer solution, pH 7.4, at 25 °C, maintaining moderated agitation by means of a magnetic stirrer. Samples (1 mL) were withdrawn every 15 min, and replaced with fresh buffer solution. After 1 h, the hydrogels were placed in 3 mL buffer, pH 7.4, at 40 °C for 1 h and the same sampling protocol as before was followed. Then, the samples were placed in media at 25 °C, with the same sampling procedure. The temperature cycles were repeated until complete solute release was obtained. Release of vitamin B₁₂ and cytochrome C was followed by UV–Vis spectroscopy at 361 and 528 nm, respectively. Solute loading was calculated from the amount of drug released after complete release was observed.

Results and discussion

MP synthesis and characterization

Monodispersed MPs were obtained with an average diameter (D_h) of 585 nm at 25 °C (PDI=0.136). The size distribution of the microparticles and the effect of temperature on their size are shown in Fig. 1a and b, respectively. The LCST is defined as the maximum size change and occurs at 32 °C, with a size of 285 nm above the LCST. EDGMA was selected as the crosslinker for the synthesis of MPs due to the good swelling/deswelling properties produced with this crosslinker, found in a previous study [30].

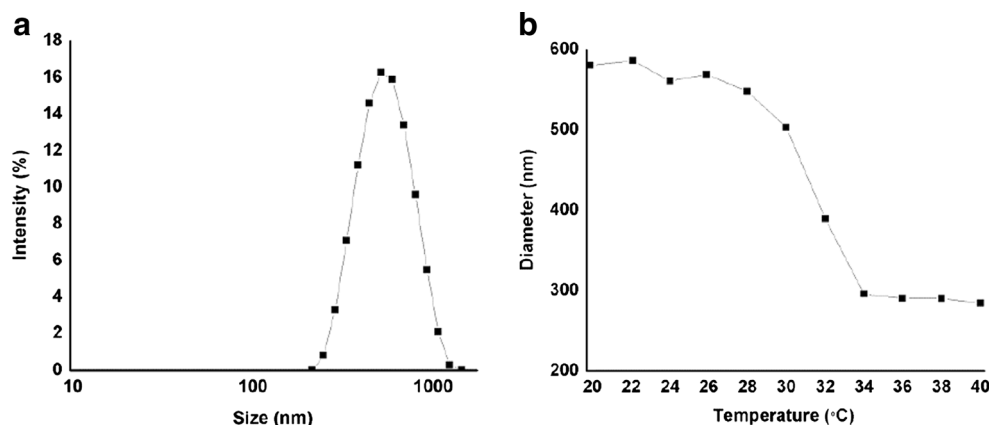
Hydrogels preparation

MPs are swollen with the polymerization mixture, as described in “[Synthesis of microparticles](#)”, during hydrogel formation, thus the hydrogel chains are formed, and chain entanglement is produced [32–34]. The swollen *NIPAAm*/MP 100/0 hydrogel is transparent, soft, and fragile. However, the samples with microstructured hydrogels are opaque; the degree of opacity increases as the proportions of MPs is increased, indicating that MP introduce inhomogeneities during hydrogel synthesis. The surface morphology of the hydrogels was investigated by SEM and micrographs are displayed in Fig. 2. The surface of the *PNIPAAm*/MP 100/0 samples are homogeneous and smooth, as shown in Fig. 2a. Although the morphology changes as the content of the microstructured hydrogels is increased in the samples, the surface tends to be irregular and rough, as shown in Fig. 2b, and even spongy, as shown in Fig. 2c.

Effect of temperature on equilibrium swelling ratio

Figure 3 shows the swelling degree Q for all hydrogels, as a function of temperature in the 20 to 40 °C range. They all have the greatest value of Q at 20 °C, which continuously decreases

Fig. 1 **a** Size distribution of the PNIPAAm microparticles at 25 °C, and **b** change of microparticle size as a function of temperature



with increasing temperature until $T \approx 34$ °C where an abrupt change occurs. The value of Q remains basically constant when $T \geq 34$ °C. The *NIPAAm/MP 100/0* and *92.5/7.5* hydrogels have similar degree of swelling at 20 °C, *NIPAAm/MP 85/15* has slightly higher degree of swelling, and *NIPAAm/MP 70/30* has 20 % higher degree of swelling, which is attributed to the inhomogeneities introduced for the MP. The hydrogel *NIPAAm/MP 85/15 DC* shows the lowest Q , as expected due to higher crosslink density and, for instance, a higher elastic force against swelling.

These results differ from those obtained by Fernandez et al. for nanostructured *PNIPAAm* hydrogels [32]. In the first state of polymerization, they prepared nanogels with an average diameter of 29.5 nm by an inverse emulsion polymerization technique and observed a higher equilibrium swelling as the proportion of nanogels increases. They observed that values of Q for the nanostructured hydrogels are up to six times greater than the conventional *PNIPAAm* hydrogel. They argue that the nanogels have a higher mass density than the macro-hydrogels and this introduces inhomogeneities in the material during the second state of polymerization (macrohydrogel formation), and porous materials are produced. As the proportion of nanoparticles increases, there is an increase on the porosity and, as a consequence, water uptake [32, 34].

In our study we use MP produced by a dispersion polymerization method with a volume about 400 times the volume used in the published study. The swelling ratio of the microparticles, defined as $[(D_{h\ 25\ ^\circ\text{C}}/D_{h\ 40\ ^\circ\text{C}})^3]$, is 8.64 which is similar to the degree of swelling of the microstructured hydrogels. This indicates that microparticles and hydrogels have similar mass densities, for instance, MP does not produce porosity in a high extent. Only the hydrogel with the maximum proportion of MP studied (30 w%) presents a slightly higher swelling at equilibrium compared to the rest of the hydrogels. Besides, in our case, the degree of swelling of the microstructured hydrogels (below the LCST) is about one order of magnitude smaller than the reported with highly porous

systems [26, 27, 35, 36], which is also indicative of distinct microstructure characteristics.

Swelling kinetics

Figure 4 shows the swelling kinetics starting from dry hydrogels at 25 °C. All curves in this figure are similar, meaning that the hydrogels have a comparable swelling kinetics because crosslinking density and porosity are alike. As shown in the inset in Fig. 4, the swelling rate decreases as a function of the elapsed time for all hydrogels [32]. At the beginning of the process, the *NIPAAm/MP 85/15 DC* hydrogel has the slowest swelling kinetics due to its higher crosslinking density. The initial rate of swelling increases with the proportion of MP, which can be attributed to the heterogeneity introduced by MP; however, the hydrogel *NIPAAm/MP 100/0* presents initial swelling rate similar to the *NIPAAm/MP 70/30*. Since MPs act as crosslinker points, *NIPAAm/MP 100/0* hydrogels has the lowest overall crosslinking density of all the hydrogels studied and that may explain the high initial swelling rate observed.

Shrinking kinetics is shown in Fig. 5 for all samples in the 25 to 40 °C temperature range. Conventional *PNIPAAm* hydrogels present very low shrinking kinetics due to the formation of a stiff layer skin-like on the surface of the hydrogel that blocks water diffusion [19, 20]. The inclusion of 7.5 w% of MP produces only a slight increase in shrinking kinetics. On the other hand, hydrogels containing MP at 15 w% (with both crosslink proportions), and 30 w% present very fast shrinking kinetics almost reaching the minimum of water retention (8 %) at the first sampling time (2 min), except for the hydrogel with double crosslinking proportion was lowest with 19 % water retention.

The results are similar to those obtained by highly porous *PNIPAAm* hydrogels where fast shrinking occurs by water ejection through the pores of the hydrogels [19, 36].

However, porosity itself does not explain the results for hydrogels studied in this work. As mentioned previously, the

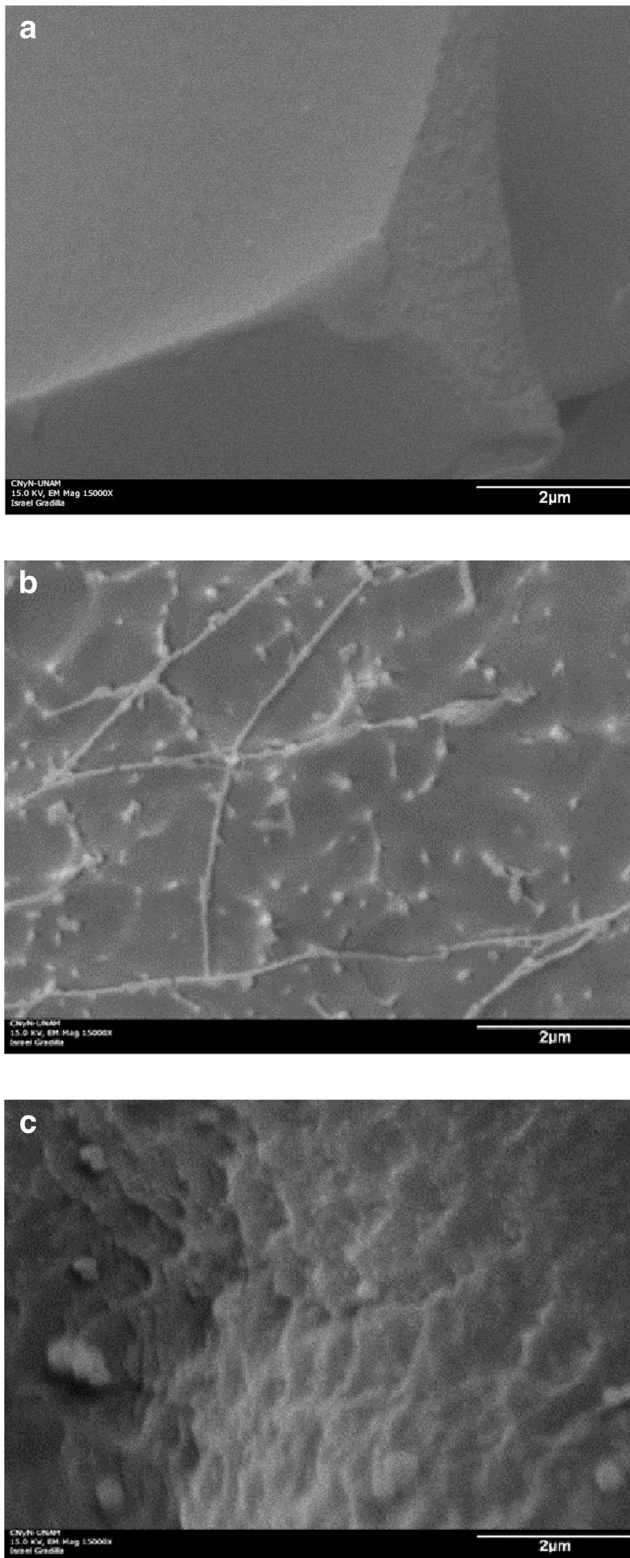


Fig. 2 SEM micrographs of hydrogels: **a** NIPAAm/MP 100/0, **b** NIPAAm/MP 85/15, **c** NIPAAm/MP 70/30

equilibrium swelling below the LCST is one order of magnitude smaller than that for porous PNIPAAm hydrogels. Besides, the hydrogels NIPAAm/MP 85/15 % and NIPAAm/MP

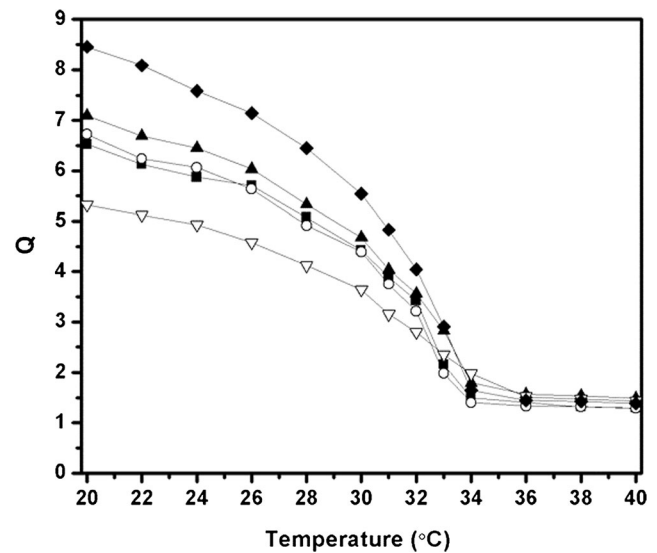


Fig. 3 Temperature dependence of equilibrium swelling degree of PNIPAAm hydrogels: (■) NIPAAm/MP 100/0, (○) NIPAAm/MP 92.5/7.5, (▲) NIPAAm/MP 85/15, (▽) NIPAAm/MP 85/15 DC, (◆) NIPAAm/MP 70/30

92.5/7.5 % have about the same degree of swelling at equilibrium, but different shrinking kinetics. For instance, we hypothesize that the fast shrinking kinetics for the microstructured hydrogels are due to a fast contraction of microparticles creating micropores that allow water diffusion during macro-hydrogel contraction (see Fig. 6). We base our hypothesis on two facts: first, microgels included in hydrogels maintain their swelling/shrinking properties [37]; and second, the rate of response of microgels is considerable faster than the macro-hydrogels, since rate of response is inversely

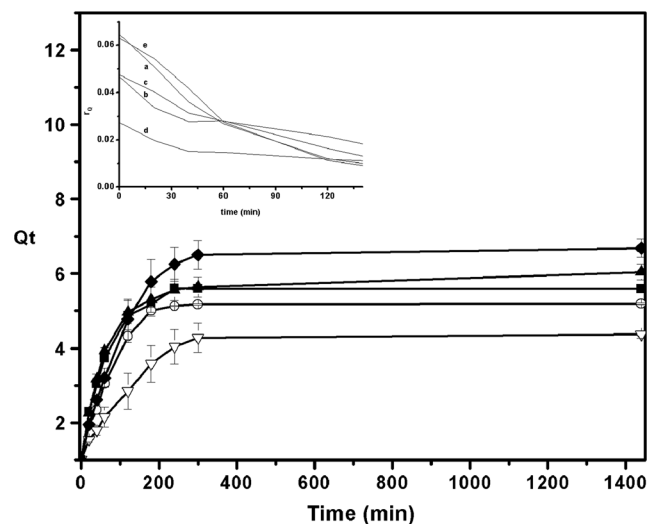


Fig. 4 Degree of swelling as a function of time at 25 °C for hydrogels: (■) NIPAAm/MP 100/0, (○) NIPAAm/MP 92.5/7.5, (▲) NIPAAm/MP 85/15, (▽) NIPAAm/MP 85/15 DC, (◆) NIPAAm/MP 70/30. Inset: Swelling rate ($\Delta Q/\Delta t$) as a function of time: **a** NIPAAm/MP 100/0, **b** NIPAAm/MP 92.5/7.5, **c** NIPAAm/MP 85/15, **d** NIPAAm/MP 85/15 DC, **e** NIPAAm/MP 70/30

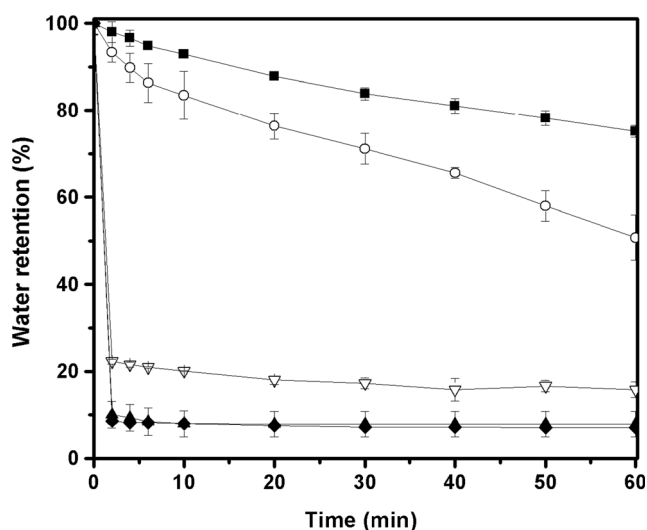


Fig. 5 Shrinkage kinetics for hydrogels: (■) *NIPAAm/MP* 100/0, (○) *NIPAAm/MP* 92.5/7.5, (▲) *NIPAAm/MP* 85/15, (▼) *NIPAAm/MP* 85/15 DC, (◆) *NIPAAm/MP* 70/30. (*NIPAAm/MP* 85/15, and *NIPAAm/MP* 70/30 (data are superimposed))

proportional to the square of the smallest spatial dimension of the hydrogel [18].

The inclusion of a very small proportion of MP in the hydrogels (e.g., 7.5 w%) is not enough to form pores that percolate the hydrogels and allows complete water expulsion when the hydrogel shrinks at temperature above the LCST.

Shrinking and swelling cycles at 40 and 25 °C, respectively, with a sampling time of 60 min per cycle are used to determine the relative swelling degree for all samples, as observed in Fig. 7 for three shrinking/swelling cycles. The curve for the *NIPAAm/MP* 100/0 hydrogels shows a small variation on the relative swelling degree in each cycle due to the formation of the skin layer at 40 °C, which results in a negligible temperature response for this hydrogel. The slope on the curve for the shrinking cycle of the *NIPAAm/MP* 92.5/7.5 hydrogel is steeper than the slope for the swelling one. Therefore, there

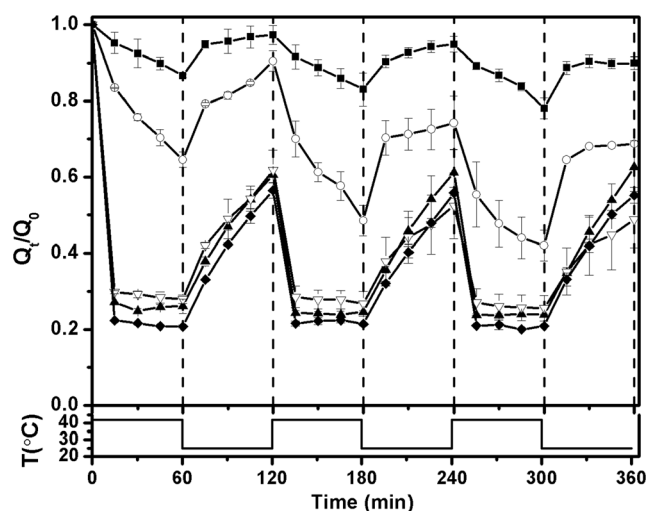


Fig. 7 Relative swelling degree (Q_t/Q_0) with cycles of temperature between 25 and 40 °C: (■) *NIPAAm/MP* 100/0, (○) *NIPAAm/MP* 92.5/7.5, (▲) *NIPAAm/MP* 85/15, (▼) *NIPAAm/MP* 85/15 DC, (◆) *NIPAAm/MP* 70/30

is a decrease of the peaks height (local maxima) for the relative swelling degree after one full cycle (one shrinking + one swelling). For instance, the Q_t/Q_0 value drops from 1 to 0.9 after the first full cycle and then to 0.68 at the end of the third cycle, as shown in Fig. 7. The other curves for the relative swelling degree for the remaining samples show an oscillating behavior very similar in between, so that the reproducible swelling/shrinking curves are produced in each temperature oscillation.

The average Young's modulus values measured by nanoindentation are shown in Table 1. There is an increase in the Young modulus of 40 % after adding just 7.5 % of MPs. An increase in the Young modulus has been observed with nanostructured hydrogels because the nanoparticles act as a crosslinking points [32–34]. The hydrogel *NIPAAm/MP* 70/30 has an average Young modulus only slightly higher than the conventional *PNIPAAm* hydrogel. This is probably due to the porosity of this hydrogel.

Macromolecules loading and release

Table 1 presents drug loadings of the hydrogels as well. Similar loadings are observed for all hydrogels except for the hydrogel *NIPAAm/MP* 85/15 DC due to its lower swelling capacity.

Release of vitamin B₁₂ (1335 Da) with temperature cycles between 25 and 40 °C is shown in Fig. 8a. Considerable release is observed in the first hour at 25 °C for all hydrogels except the hydrogel *NIPAAm/MP* 92.5/7.5. Temperature jump to 40 °C halts drug release for the *NIPAAm/MP* 100/0 hydrogel. Decreasing the temperature to 25 °C reinitiates drug release. These results confirm the formation of a dense skin on the surface of the hydrogel that blocks drug release when

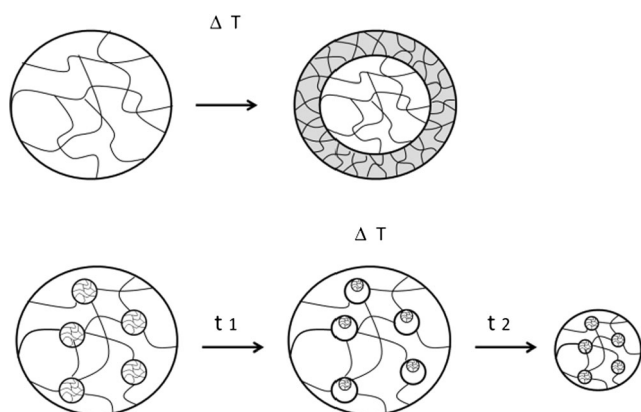


Fig. 6 Proposed mechanism for the shrinking process in thermosensitive hydrogels. Formation of a skin-like layer in a conventional *PNIPAAm* hydrogel (top). Formation of micropores by the contraction of the microgels followed by shrinkage of the macro-hydrogel (bottom)

Table 1 Mechanical properties and solute loading of the hydrogels studied

Hydrogel <i>NIPAAm</i> /MP %w	Young's modulus (GPa)	Loading vitamin B ₁₂ (mg/g)	Loading cytochrome C (mg/g)
100/0	2.02	0.604	0.527
92.5/7.5	2.79	0.555	0.556
85/15	2.61	0.587	0.577
85/15 DC	2.48	0.332	0.303
70/30	2.13	0.502	0.477

temperature is raised above the LCST. For hydrogel *NIPAAm*/MP 70/30 release is extensive at 25 °C in the first hour (>80 %), and no effect of increasing the temperature is observed. These results are attributed to the higher swelling of this hydrogel. For the hydrogels *NIPAAm*/MP 85/15, with

both degrees of crosslinker, the release is also extensive at 25 °C, but an increase on rate of release is observed at temperature above the LCST (Fig. 8b). In these cases all drug is released in the first cycle of temperature. The hydrogel

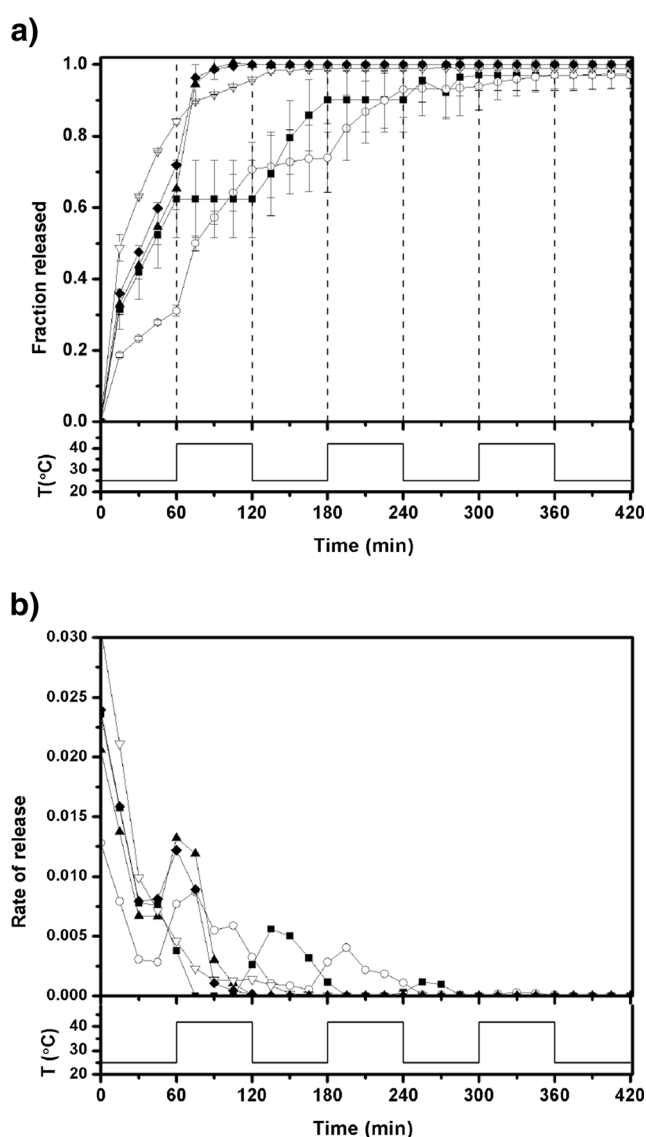


Fig. 8 a Releasing vitamin B₁₂ in cycles of temperature and b rate of release (mg/min) normalized by the drug loading: (■) *NIPAAm*/MP 100/0, (○) *NIPAAm*/MP 92.5/7.5, (▲) *NIPAAm*/MP 85/15, (◆) *NIPAAm*/MP 85/15 DC, (▽) *NIPAAm*/MP 70/30

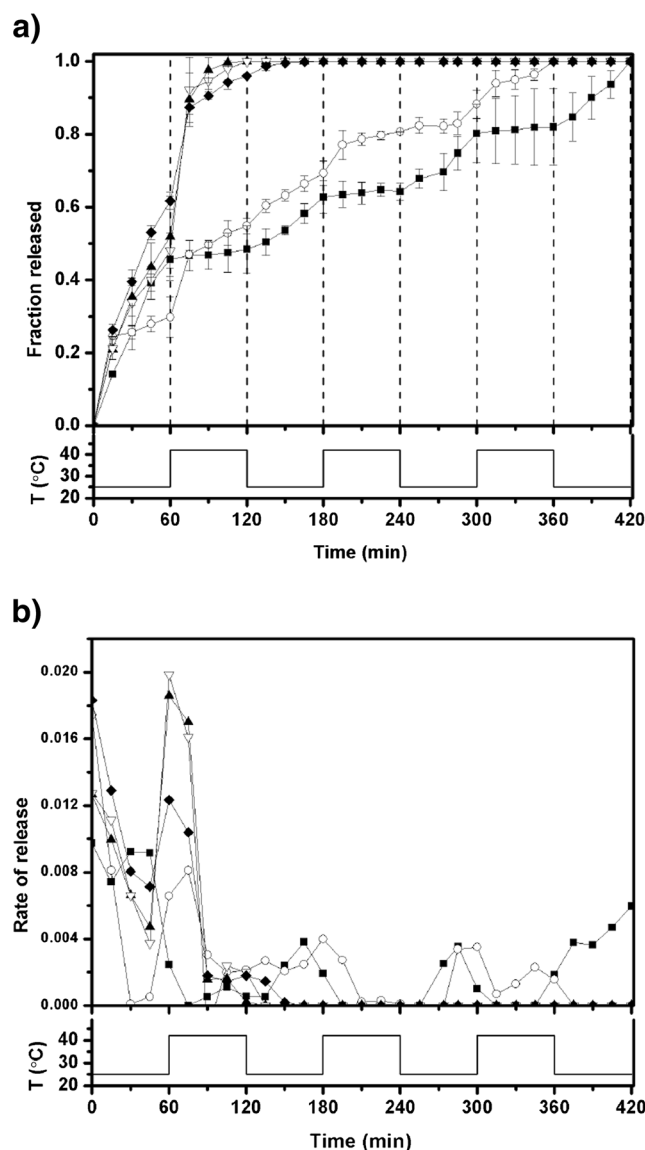


Fig. 9 a Releasing of cytochrome C in cycles of temperature and b rate of release (mg/min) normalized by the drug loading: (■) *NIPAAm*/MP 100/0, (○) *NIPAAm*/MP 92.5/7.5, (▲) *NIPAAm*/MP 85/15, (◆) *NIPAAm*/MP 85/15 DC, (▽) *NIPAAm*/MP 70/30

NIPAAm/MP 92.5/7.5 shows a smaller release in the first hour at 25 °C and a clear increase in rate of release at 40 °C, decreasing the rate of release as the temperature is back at 25 °C. The process is repeated in each cycle of temperature but the amount of drug released decreases in each temperature cycle as the release becomes complete.

Figure 9a presents cytochrome C (12,000 Da) release with cycles of temperature. Rate of release is somewhat slower than for vitamin B₁₂ due to the higher molecular weight of cytochrome C. For the hydrogel *NIPAAm/MP 100/0* drug release is halted at 40 °C in each cycle and release only occurs at 25 °C, as observed for vitamin B₁₂. For the hydrogels *NIPAAm/MP 85/15* (both crosslinker proportions) and *NIPAAm/MP 70/30* a clear increase on rate is observed at 40 °C (Fig. 9b) with the whole load released in the first temperature cycle. For the hydrogel *NIPAAm/MP 92.5/7.5* pulses of release are observed at 40 °C in each cycle, taking three cycles for complete release of the solute.

Conclusion

Inclusion of PNIPAAm microparticles in PNIPAAm hydrogels produces fast thermoresponsive materials with improved mechanical properties. The microstructured hydrogels present similar swelling at equilibrium than the conventional PNIPAAm hydrogels indicating similar porosities. We propose that fast shrinking of microstructured hydrogels above the LCST is due to the formation of micropores by the contraction of the MP before macro-hydrogel shrinkage, allowing water expulsion and avoiding the formation of a skin-like layer on the surface of the hydrogels. Conventional PNIPAAm hydrogels present a skin-like formation and shows negative solute control on drug release (release below the LCST). On the other hand, microstructured hydrogels present positive drug release control. Pulsatile solute release controlled by temperature can be obtained when small proportion of MP are included in the hydrogels, otherwise release is too fast for a controlled release system. The degree of crosslinking has a smaller impact than the proportion of MP in swelling and drug release in response to temperature.

Fast release of solutes was obtained when temperature raise above the LCST, indicating that these systems can be used to release therapeutic agents that require peaks in the serum concentration at predetermined intervals (e.g., hormones) [38].

A facile and scalable method was adapted to produce materials with fast temperature response and improved mechanical properties with high potential for application in several fields, including drug delivery. All the polymerization steps are carried on in aqueous media, being an environmentally friendly technology.

Acknowledgments Work supported by SEP-CONACYT grant (CB2010-1-157173) and (C0010-2011-01- 174492). JMCB thanks CONACYT for Abroad Sabbatical Stay fellowship (232833).

References

1. Bhattacharya S, Eckert F, Boyko V, Pich A (2007) Temperature-, pH-, and magnetic-field-sensitive hybrid microgels. *Small* 3(4): 650–657
2. Taylor L, Cerankowski L (1975) Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions—a study of lower consolute behavior. *J Polym Sci Polym Chem* 13(11):2419–2639
3. Hirokawa Y, Tanaka T (1984) Volume phase transition in a nonionic gel. *J Chem Phys* 81(12):6379–6380
4. Gutowska A, Bae YH, Jacobs H, Mohammed F, Mix D, Feijen J, Kim SW (1995) Heparin release from thermosensitive polymer coatings: in vivo studies. *J Biomed Mater Res* 29(7):811–821
5. Vakkalanka S, Brazel C, Peppas N (1997) Temperature- and pH-sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase. *J Biomater Sci Polym* 8(2):119–129
6. Chung JE, Yokoyama M, Yamato M, Aoyagi T, Sukurai Y, Okano T (1999) Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J Control Release* 62(1–2):115–127
7. Freitas RF, Cussler EL (1987) Temperature sensitive gels as extraction solvents. *Chem Eng Sci* 42(1):97–103
8. Chu LY, Park SH, Yamaguchi T, Nakao S (2001) Preparation of thermo-responsive core-shell microcapsules with a porous membrane and poly(N-isopropylacrylamide) gates. *J Membr Sci* 192(1–2):27–39
9. Hulse JA, Rosenthal SM, Cutler L (1986) The effect of pulsatile administration, continuous infusion, and diurnal variation on the growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 63(4):872–878
10. Tam CS, Heersche JN, Murray TM (1982) Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 110(2):506–512
11. Klabunde RE, Burke SE, Henking J (1990) Enhanced lytic efficacy of multiple bolus injections of tissue plasminogen activator in dogs. *Thromb Res* 58(5):511–517
12. Clark RG, Jansson JO, Isaksson O (1985) Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 104:53–61
13. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202(4368):631–633
14. Vaage J, Pauly JL, Harlos JP (1987) Influence of the administration schedule on the therapeutic effect of interleukin-2. *Int J Cancer* 39(4):530–533
15. Kikuchi A, Okano T (2002) Pulsatile drug release control using hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 54(1):53–77
16. Qui Y, Park K (2001) Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 53(3):321–339
17. Brazel CS, Peppas NA (1996) Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *J Control Release* 39(1):57–64
18. Tanaka T, Fillmore D (1979) Kinetics of swelling of gels. *J Chem Phys* 70(3):1214–1218

19. Imran AB, Seki T, Takeoka Y (2010) Recent advances in hydrogels in terms of fast stimuli responsiveness and superior mechanical performance. *Polym J* 42:839–851
20. Zhang X, Wu D, Chu CC (2004) Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH sensitive Dex-MA/PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials* 25(19):4719–4730
21. Wu XS, Hoffman AS, Yager P (1992) Synthesis and characterization of thermally reversible macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 30(10):2121–2129
22. Kaneko Y, Sakai K, Kikuchi A, Yoshida R, Sakurai Y, Okano T (1995) Influence of freely mobile grafted chain length on dynamic properties of comb-type grafted poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Macromolecules* 28(23):7717–7723
23. Xue W, Hamley IW, Huglin MB (2002) Rapid swelling and deswelling of thermoreversible hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels prepared by freezing polymerization. *Polymer* 43(19):5181–5186
24. Zhang XZ, Zhuo RX (2000) Preparation of fast responsive, thermally sensitive poly(N-isopropylacrylamide) gel. *Eur Polym J* 36(10):2301–2303
25. Zhang XZ, Zhuo RX (2002) Synthesis and properties of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-methyl methacrylate) hydrogel with rapid response. *Mater Lett* 52(1–2):5–9
26. Cheng SX, Zhang JT, Zhuo RX (2003) Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved protein release properties. *J Biomed Mater Res* 67A(1):96–103
27. Zhang JT, Cheng SX, Huang SW, Zhu RX (2003) Temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with macroporous structure and fast response rate. *Macromol Rapid Commun* 24(7):447–451
28. Lugo-Medina E, Licea-Claverie A, Comejo-Bravo JM, Arndt KF (2007) Effect of method of preparation on properties of temperature and pH-sensitive gels: chemical crosslinking versus irradiation with e-beam. *React Funct Polym* 67(1):67–80
29. Serrano-Medina A, Comejo-Bravo JM, Licea-Claverie A (2012) Synthesis of pH and temperature sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *J Colloid Interface Sci* 369(1):82–90
30. Obeso-Vera C, Comejo-Bravo JM, Serrano-Mediana A, Licea-Claverie A (2013) Effect of crosslinkers on size and temperature sensitivity of poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *Polym Bull* 70:653–664
31. Parr GM, Oliver WC (1992) Measurement of thin film mechanical properties using nanoindentation. *MRS Bull* 17(7):28–33
32. Fernandez VVA, Tepale N, Sanchez-Diaz JC, Mendizabal E, Puig JE, Soltero JFA (2006) Thermoresponsive nanostructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels made via inverse microemulsion polymerization. *Colloid Polym Sci* 284(4):387–395
33. Fernandez VVA, Aguilar J, Becerra F, Sanchez-Diaz JC, Soltero JFA, Ortega-Gudiño P, Hernandez E, Bautista F, Puig JE (2013) Tailoring thermoresponsive nanostructured poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels made with poly(acrylamide) nanoparticles. *Colloid Polym Sci* 291(8):1829–1842
34. Nuño-Donlucas SM, Sánchez Diaz JC, Rabelero M, Cortes-Ortega J, Luhrs-Olmos CC, Fernandez-Escamilla VVA, Mendizábal E, Puig JE (2004) Microstructured polyacrylamide hydrogels made with hydrophobic nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 270(1):94–98
35. Zhang XZ, Zhuo RZ (1999) A novel method to prepare a fast responsive, thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel. *Macromol Rapid Commun* 20(4):229–231
36. Qin A, Lu M, Liu Q, Zhang P (2007) Synthesis and characterization of thermo-sensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel with fast response rate. *Front Chem Chin* 2(2):135–139
37. Musch J, Shneider S, Linder P, Richtering W (2008) Unperturbed volume transition of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles embedded in a hydrogel matrix. *J Phys Chem B* 112(20):6309–6314
38. Peppas N, Leobandung W (2004) Stimuli-sensitive hydrogels: ideal carriers for chronobiology and chronotherapy. *J Biomater Sci Polym Ed* 15(2):125–144

Anexo B: Microstructured hydrogels with modulated transition temperature for positive control release

Authors: K. Palomino, J.M. Cornejo-Bravo, H. Magaña and A. Serrano-Medina,

Article: Microstructured hydrogels with modulated transition temperature for positive control release

Journal: Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures

Volume: 13

Year: 2018

Pages: 141- 154

ISSN: 18423582

MICROSTRUCTURED HYDROGELS WITH MODULATED TRANSITION TEMPERATURE FOR POSITIVE CONTROL RELEASE

K. PALOMINO^a, J. M. CORNEJO-BRAVO^a, H. MAGAÑA^a,
A. SERRANO-MEDINA^{b*}

^a*Autonomous University of Baja California, 14418 University Street, International Industrial Park, Tijuana, Baja California 22300, Mexico.*

^b*Faculty of Medicine and Psychology, Autonomous University of Baja California, 14418 University Street, International Industrial Park, Tijuana, Baja California 22300, Mexico.*

In this work we prepared microgels of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) with the swollen-unswollen temperature transition modulated above the body temperature (37 °C), by copolymerization with acrylamide or N,N-dimethylacrylamide. The microgels were used to produce microstructured hydrogels of NIPAAm, also with the temperature modulated with the comonomers. We found that the microstructured hydrogels present fast temperature response when temperature is changed from 37 °C to 42 °C. The shrinking-swelling process was reversible when the temperature was cycled between the two temperatures. However, since the temperature induced transition of the hydrogels was continuous, the change in degree of swelling between the two temperatures was smaller than the change between 25°C and 42°C. Solute release studies shows fast release of vitamin B₁₂ without temperature control, but temperature controlled release of cytochrome C.

(Received November 21, 2017; Accepted January 22, 2018)

Keywords: Hydrogels, microgels, NIPAAm, Transition temperature, Drug release

1. Introduction

Hydrogels have become very important for a range of biotechnology applications including drug delivery [1,2], tissue engineering [3,4], artificial muscles [5], wound dressings and diagnostics; due to their unique properties such as high water content, softness, flexibility and biocompatibility [6–8]. These materials can be prepared with different sizes, presenting differences on the speed of response to different environmental stimuli such as temperature, pH, ionic strength, and chemical species [9,10]. Nanogels and microgels are of particular interest given their fast response due to their reduced dimensions [11].

Thermosensitive polymeric materials present changes in the material structure below and above a transition temperature, T_{tr} , related to the lower critical solution temperature (LCST) [12,13]. Among temperature sensitive hydrogels, poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) is the most commonly studied material. It has a swollen-shrunk T_{tr} around 32 °C, which is near the human body temperature, and thus has applications in biomedicine [14–16]. Additionally, since the T_{tr} of PNIPAAm can be adjusted to be higher than the body temperature and, it could be used for positive temperature controlled release; this is, for the release of the loaded drug when the temperature rises above the T_{tr} , and the hydrogels shrink. This tuning can be obtained by copolymerizing with hydrophilic or ionizable monomers [17–20], such as acrylic acid [21], methacrylic acid [22], poly(N-vinylcaprolactam) [23], N,N-(dimethyl amino)ethyl methacrylate, polyethylene glycol [24], etc. Positive release control is relevant since increase in body temperature above normal occurs in certain pathologies, or can be induced either locally or systemically [25,26].

*Corresponding autor: serrano.aracely@uabc.edu.mx

The main problems suffered by hydrogels are poor mechanical properties [27], and slow response rates [28]. Additionally, NIPAAm hydrogels present a skin like formation in the surface that limits shrinking and drug delivery, when heated above their T_{tr} [29]. The solution to such problems have been approached in different opportunities by incorporating nanoparticles in the hydrogels which generates fast shrinking and improved mechanical properties [30,31].

We previously studied NIPAAm hydrogels containing NIPAAm microgels that present fast temperature response and improved mechanical properties. We proposed that when the swollen microstructured hydrogels are exposed to temperatures above their T_{tr}, fast shrinking of the included microgels generates pores that allow the expulsion of water during the shrinking of the (macro)hydrogels. Those materials presented reproducible swelling-shrinking cycles when temperature was cycled below and above its T_{tr} (32 °C), producing a pulsed drug release in response to temperature changes between 25 °C and 42 °C [32].

Pulsed drug release is very important for improving the therapeutic effect of many bioactive molecules, particularly hormones [33–35]. However, we require temperature sensitive materials with T_{tr} above 37 °C so pulsed drug release occurs when temperature rises above this temperature to a maximum of 42 °C, a temperature below the threshold for body heat sensors [36].

In this work we tuned the transition temperature of NIPAAm microgels and microstructured hydrogels by copolymerization with N,N-dimethylacrylamide or acrylamide. Modulated temperature transition materials were used for the temperature controlled release of model substances vitamin B₁₂ and cytochrome C.

2. Experimental

N-Isopropylacrylamide NIPAAm (TCI, 98%) was recrystallized from n-hexane. N,N-dimethylacrylamide (DMA) (Sigma-Aldrich) and ethyleneglycoldimethylacrylate (EGDMA) (Aldrich, 98%) were purified by passing for an inhibitor removing resin (Aldrich). Acrylamide (AAm) (Sigma-Aldrich), N,N-methylenebisacrylamide (BIS) (Aldrich, 98%), ammonium persulfate (APS) (Aldrich, 98%), N, N, N, N-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Aldrich, 99.5%), Vitamin B₁₂ (Sigma Aldrich) and cytochrome C (Sigma Aldrich) were used as received. Milli-Q water was filtered through a filter with a 0.22µm pore size.

Statistical analysis was performed by two way ANOVA using PRISM (GraphPad Software Inc, San Diego CA).

2.1 Synthesis of microgels (MG)

Microgels were prepared through dispersion polymerization. NIPAAm was copolymerized with AAm (10, 15 and 20% mol%) or DMA (10, 20, and 30 mol%), crosslinked by EGDMA 3 mol% with respect to the monomers. The monomers were added in Milli-Q water. The solution was bubbled with nitrogen to remove oxygen, then heated to 85 °C, before adding initiator APS 2% w/w with 200 rpm stirring for 45 min. After that, the reaction mixture was placed in an ice bath to stop the reaction. The resulting dispersion was dialyzed against water for 5 days using a 14 kDa membrane (Spectrum Laboratories). Microgels were finally lyophilized.

2.2 Characterization of microgels

The microgels were characterized by FTIR-ATR with a Thermo Scientific model Nicolet Is5 spectrometer in ATR mode using 16 scans, taken in the range of 4000-600 cm⁻¹

Microgels were reconstituted in MilliQ water with a concentration of 1 mg/mL, the hydrodynamic diameter (D_h) was obtained by dynamic light scattering (DLS) using the Zetasizer (DTS1060; Malvern Instruments, Miami FL), with a green laser 532 nm with a reading angle of 173°.

The size distribution is reported in volume and the effect of temperature on the microgels was studied between 20 to 50 °C.

STEM images of the microgels were acquired with a Field Emission Scanning Electron Microscope, Model JSM-7800F Prime. For this, a droplet of nano/microparticulate dispersion (0.4 w%) was spread onto the surface of a 400- mesh copper carbon grid. Two droplets of uranyl

acetate (2 w%) were added to the copper carbon grid. The samples were vacuum-oven dried at 22 °C for 24 h. The dried specimens were clamped onto a STEM specimen rod, inserted into the sample chamber, and observed at 25 kV.

2.3 Synthesis of copolymeric hydrogels

Hydrogels were prepared with NIPAAm and AAm or DMA at 0, 10, 20 mol% and crosslinker N-methylenebisacrylamide 3% w/w. Monomers were dissolved in Milli Q water, and stirred for 15 min, then APS 0.15 M and TEMED 0.15 M were added and shaken for 1 min. The solution was placed between two 10 x 10 cm glass plates for 24 h at 4 °C. The obtained hydrogels were cut into 1 cm (diameter) discs and were washed with water for 5 days.

Microstructured hydrogels were prepared in the same fashion but a certain weight of microgels was introduced in the feed recipe to obtain the desired composition.

2.4 Scanning electron microscopy of hydrogels

The structure and morphology of lyophilized samples of the hydrogels were studied by scanning electron microscopy (Field Emission Scanning Electron Microscope, Model JSM-7800F Prime).

2.5 Determination of equilibrium swelling ratio

The swelling equilibrium was determined for hydrogels in water at temperatures ranging from 20 to 50 °C. After immersion in distilled water at a predetermined temperature, the hydrogels were removed, the excess water on the hydrogel surface was eliminated, and then the hydrogel was weighed. Degree of swelling, Q , was determined by:

$$Q = \frac{(W_s - W_d)}{W_d}$$

Where W_s is the weight of a hydrogel swollen to equilibrium at a given temperature, and W_d is the weight of the dry gel. The T_{tr} is defined as the temperature at which a maximum weight change occurs. Measurements were made by triplicate.

2.6 Determination of kinetic swelling of hydrogels

The swelling kinetics of hydrogels was determined gravimetrically. The dried hydrogels were placed in water at 25 °C, and subsequently were weighed at regular times. Finally, the swelling degree at different sampling times (Q_t) was determined by the equation,

$$Q_t = \frac{(W_t - W_d)}{W_d}$$

Where W_t is the weight of hydrogel at the sampling time and the W_d is the dry weight hydrogel. Measurements were made by triplicate.

2.7 Determination of shrinking kinetics

Dried hydrogels were weighed and placed in water at 25 °C. After 24 h, the hydrogels were weighed and immersed in water at 42 °C, during which the weights of the hydrogels were recorded at 10 min intervals. Prior to being weighed, the hydrogels surface water was absorbed with a Kimwipe. Water retentions were calculated with equation:

$$\text{Water Retention} = 100 \times \frac{(W_t - W_d)}{W_s}$$

Where W_t is the weight of hydrogel at the sampling time, W_d is dry weight hydrogel and W_s is the weight of a hydrogel swollen to equilibrium at a given temperature. Measurements were made by triplicate.

2.8 Determination of oscillating deswelling-swelling kinetics

Swollen hydrogels were cycled between two sets of temperatures: 42 and 25 °C, and also 42 and 37 °C with one hour at each temperature, weighing the hydrogels every 15 min and evaluating the water retention in each sampling point. Measurements were made by triplicate.

2.9 Loading and release of model substances into hydrogels

Model substances for this study were vitamin B₁₂ (1335 Da) and cytochrome C (12000 Da). The loading was done by swelling the hydrogels in a phosphate buffer pH 7.4, containing 10 mg/mL of the solutes, at 4 °C for 7 days. Releases were performed using two different temperature cycles these being 25 to 42 °C and 37 to 42 °C. Before the release study, the hydrogels in loaded media were equilibrated at the release temperature (25 or 37°C) for 2 h. Then, loaded hydrogels were placed in 3 mL of buffer pH 7.4 with stirring at 25 °C, taking a 1 mL sample every 15 min in replacing media with fresh buffer equilibrated at 25 °C. After one hour the hydrogels were placed in the medium at 42 °C. Maintaining the sampling protocol by cycling the temperature every hour, until complete release of the model substances was observed. The same procedure was performed with temperature cycles between 37 °C and 42 °C. Concentration of model substances was determined using a UV–Vis spectrophotometer at a wavelength of 361 nm for vitamin B₁₂ and 528 nm for cytochrome C. The assays were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1 Synthesis and characterizations of microgels

Copolymeric NIPAAm microgels (MG) were synthesized by dispersion polymerization. EGDMA was chosen as the crosslinker since good swelling/deswelling properties of microgels synthesized with this crosslinker have been observed [37,38].

Fig. 1 presents the FT-IR spectra for selected microgels. A broad band appeared between 3600 cm⁻¹ and 3100 cm⁻¹ (N-H stretching). Peaks appear at 1635 cm⁻¹ and 1538 cm⁻¹, which are due to the presence of the amide groups (amide band I and II, respectively), and at 1385 cm⁻¹ corresponding to the C-H bending vibrations of CH(CH₃)₂. For the microgels NIPAAm/DMA (90:10) a peak is observed at 1725 cm⁻¹ corresponding to the stretching of the carbonyl group of the crosslinker EGDMA. The small intensity of the peak is due to the small proportion of the crosslinker (3 mol%). For the NIPAAm/AAm (90:10) microgels this peak overlaps with the signal at 1635 cm⁻¹, so only a shoulder is observed. Similar signals are observed for the rest of the microgels, which correspond to the signals for the chemical bonds expected in the materials.

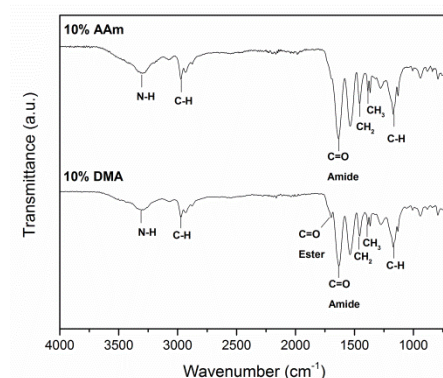


Fig. 1. FTIR of copolymeric NIPAAm microgels

Table 1 shows the average hydrodynamic diameter (Dh) at 25 °C, polydispersity index (PDI), yield, and Ttr of the microgels synthesized. Interestingly, the microgels containing DMA are smaller and decrease in size as the proportion of DMA increases. Apparently DMA has emulsifying properties which decreases the size of the microgels [39]. Figure 2 presents STEM images of microgels NIPAAm/AAm (90:10) and NIPAAm/DMA (90:10), which corroborate the micro/nanometric dimensions obtained by DLS measurements of the materials synthesized.

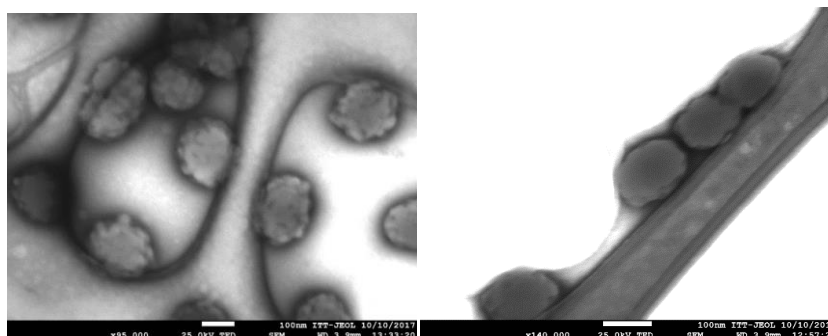


Fig. 2. STEM images of microgels: left NIPAAm/AAm (90:10), right NIPAAm/DMA (90:10)

Fig. 3 shows the effect of temperature on the size of the synthesized microgels. The Ttr was calculated as the point of maximum change of the curves (Table 1). NIPAAm MG's shows similar size to the reported [40,41] keeping their Ttr at 32 °C. MG's containing different percentages of DMA show a minimal increase in Ttr, with Ttr of 36 °C for the microgels with 30% DMA in the feed. However, Ttr of microgels NIPAAm/AAm in different percentages is higher than body temperature, showing 38 °C at 10% and 15% of AAm and 40 °C for 20% of AAm. These results agree with the reported in the literature where the Ttr of NIPAAm was increased by these copolymers [42,43].

Table 1. Properties of microgels synthesized

	Dh (nm) @ 25 °C	PDI	Yield (%weight)	Ttr (°C)
NIPAAm	579	0.078	71	32
NIPAAm/DMA (90:10)	497	0.111	80	34
NIPAAm/DMA (80:20)	363	0.085	86	34
NIPAAm/DMA (70:30)	360	0.013	86	36
NIPAAm/AAm (90:10)	610	0.172	70	38
NIPAAm/AAm (85:15)	765	0.196	73	38
NIPAAm/AAm (80:20)	804	0.443	68	40

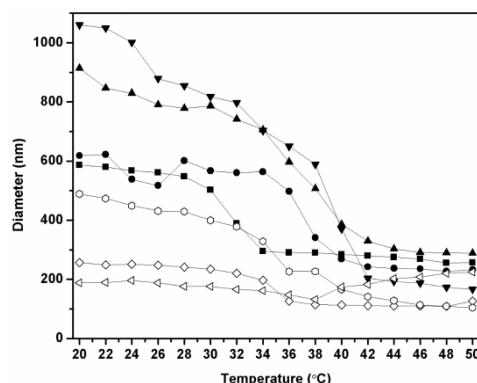


Fig. 3. Size as a function of temperature from 20 at 50 °C of different MG's: NIPAAm (■), NIPAAm/AAm (90:10) (●), NIPAAm/AAm (85:15) (▲), NIPAAm/AAm (80:20) (▼), NIPAAm/DMA (90:10) (◇), NIPAAm/DMA (80:20) (○) and NIPAAm/DMA (70:30) (◁).

3.2 Equilibrium swelling of hydrogels

Fig. 4 shows equilibrium swelling degree for the hydrogels in the temperature range from 20 to 50 °C. NIPAAm hydrogels show the Ttr at 32 °C (point of maximum change) as found in the literature. Meanwhile for the copolymeric hydrogels NIPAAm/DMA (90:10) have a transition at 36 °C while the hydrogel NIPAAm/DMA (80:20) shows a continuous decrease of swelling with temperature, presenting a drop in size at 42 °C. On the other hand NIPAAm/AAm (90:10) and (80:20) show a continuous swelling transition without a clear inflection point, with the curves shifting to higher temperature as the proportion of AAm increases. The continuous transition, lacking a clear critical value, is a phenomenon attributed to inhomogeneities in the composition of the hydrogels [44]. In such case, Ttr is defined as the temperature at which the hydrogels collapsed to half of their maximum shrinkage. These results are similar to those found in the literature [42]. Table 2 presents the Ttr for the hydrogels.

Table 2. Ttr for the synthesized hydrogels

Hydrogels	Ttr (°C)
NIPAAm	32
NIPAAm/DMA (90:10)	36
NIPAAm/DMA (80:20)	42
NIPAAm/AAm (90:10)	36
NIPAAm/AAm (80:20)	36

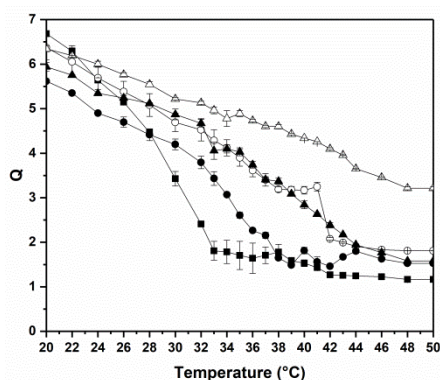


Fig. 4. Temperature dependence of equilibrium swelling degree of hydrogels NIPAAm (■), NIPAAm/DMA (90:10) (●), NIPAAm/DMA (80:20) (○), NIPAAm/AAm (90:10) (▲), NIPAAm/AAm (80:20) (△).

3.3 Swelling properties of microstructured hydrogels

According to the swelling response to temperature found in the previous sections we decide to use NIPAAm/DMA (80:20) as the copolymeric hydrogel composition of study and prepare hydrogels containing 15 w% of NIPAAm microgels, 15 and 30 w% of MG of two compositions NIPAAm/AAm (85:15) and NIPAAm/AAm (80:20), for the further studies.

Conventional hydrogels are transparent whilst microstructured hydrogels are opaque, indicating the microgels introduce inhomogenities during hydrogel synthesis. Figure 5 present SEM micrographs of conventional hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) and microstructured copolymeric hydrogel containing 30% MG NIPAAm/AAm (80:20). Conventional hydrogel is observed as a non-porous material while the microstructured hydrogel is observed as porous materials.

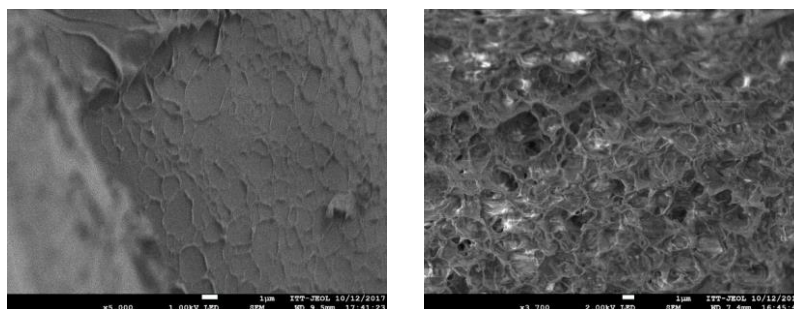


Fig. 5. SEM of hydrogels, left: conventional hydrogel, right: microstructured hydrogel.

Fig. 6 presents the effect of temperature on the degree of swelling for the microstructured gels. All of them present a continuous transition with about the same degree of swelling ($P=0.20$), except for the microstructured hydrogels with NIPAAm microgels which present less swelling ($P<0.05$).

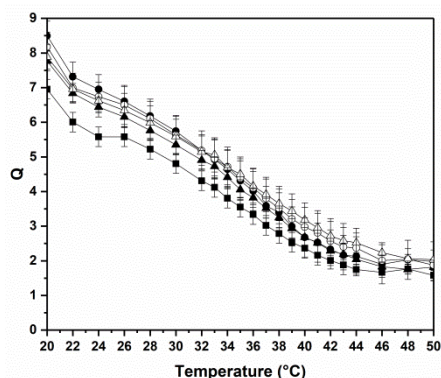


Fig. 6. Degree of swelling as a function of temperature for microstructured hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○), 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (△)

Fig. 7 presents swelling kinetics from dry hydrogels for the different materials studied. Equilibrium is reached in about 200 min. In general the microstructured hydrogels present faster swelling ($P<0.05$), and higher equilibrium swelling ($P<0.05$), attributed to the inhomogenities introduce by the microgels. The highest swelling is for the hydrogels with higher proportion of microgels (30%), with the highest proportion of AAm (20%).

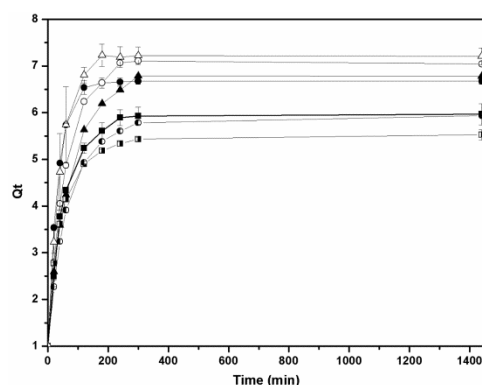


Fig. 7. Degree of swelling as a function of time at 25 °C for microstructured hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○), 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (△) and, for conventional hydrogels: NIPAAm/DMA (90:10) (◻), and NIPAAm/DMA (80:20) (◐).

Shrinking kinetics was determined in two different experiments. In the first the hydrogels were swollen at equilibrium at 25 °C and then placed at 42 °C. In Fig. 8 we observe that conventional hydrogels (without microgels) shrink slowly due to the formation of the skin that precludes water expulsion [29,45]. On the other hand microstructured hydrogels have fast response reaching minimum water retention at the first sampling period of 10 min (Figure 9) ($P < 0.01$). The lowest water retention is observed for the hydrogel that contains NIPAAm microgels ($P < 0.05$). The tendency is lower water retention for the hydrogels containing microgels with less proportion of AAm. As mentioned earlier, the fast shrinking response is produced by the formation of pores in the hydrogels due to the fast shrinking of the included microgels.

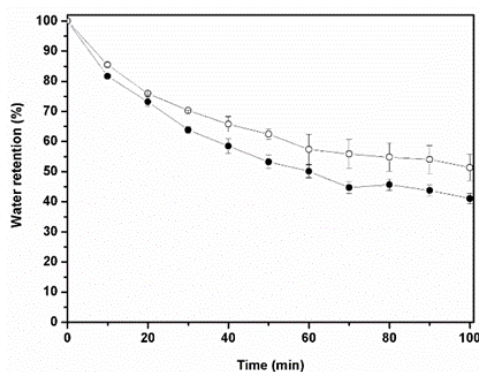


Fig. 8. Shrinking kinetics from 25 to 42 °C, for conventional hydrogels NIPAAm/DMA (90:10) (●), NIPAAm/DMA (80:20) (○).

The second study was to measure water retention after equilibration at 37 °C and heating at 42 °C. Fast response of the microstructured hydrogels is also observed in Figure 9, but with less water lost ($P < 0.01$). This occurs because, given the continuity of the transition, a considerable shrinking of the microstructured hydrogels has occurred at 37 °C, as a consequence the difference in water content in the hydrogels at both temperatures is decreased.

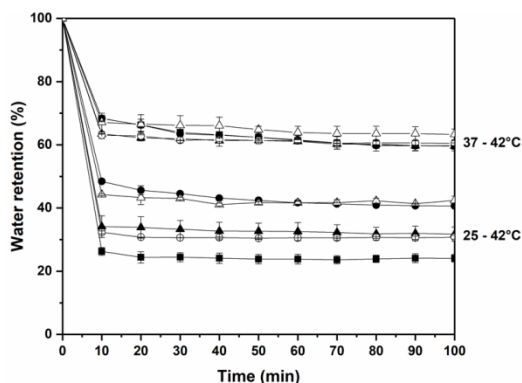


Fig. 9. Shrinking kinetics for hydrogels as a function of time at different equilibrium temperature for hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (100:0) (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○) and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (Δ).

The swelling-deswelling kinetics was determined by cycling the temperature from 25 °C to 42 °C (Figure 10a) or from 37 °C to 42 °C (Figure 10b) for the microstructured hydrogels. Temperature was maintained at each temperature for 1 h. Due to the fast shrinking the process was reversible in both cases. There is about 30% difference in water retention between the swollen and shrunken states for the cycles from 25 °C to 42 °C and about 15% for the change from 37 °C to 42 °C. Again, the difference in water retention is due to the continuity of the Q vs temperature curves, since at 37 °C significant shrinking of the hydrogels had occurred.

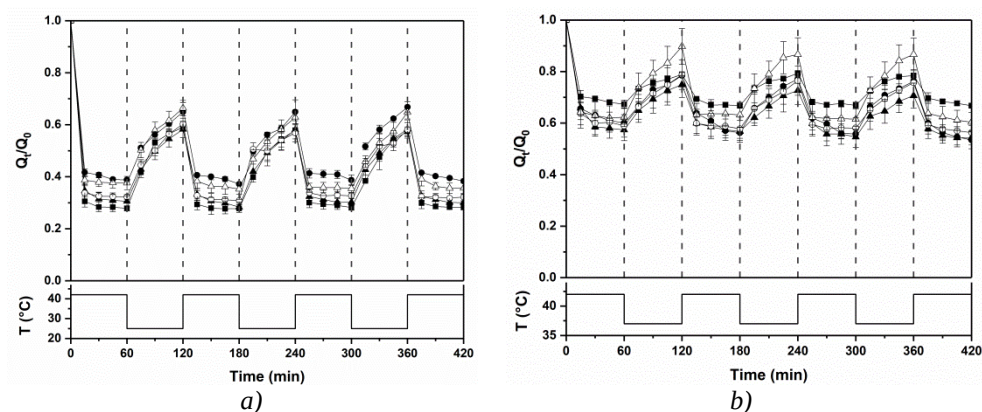


Fig. 10. Relative swelling degree (Q/Q_0) with cycles of temperature **a)** 25 and 42 °C, **b)** 37 and 42 °C for hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (100:0) (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○) and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (Δ).

3.4 Release for model substances

Table 3 presents the loading of vitamin B₁₂ and cytochrome C in the microstructured hydrogels. Higher loadings of cytochrome C than of vitamin B₁₂ are observed. Loading occurs at 4 °C and the samples are equilibrated at higher temperature before the release study resulting in trapping of the higher molecular weight solute (cytochrome C).

Table 3. Loading of the solutes in the studied hydrogels

Hydrogels NIPAAm/DMA(80:20) with	Temperature before release (°C)	Loading vitamin B ₁₂ (mg/g)	Loading cytochrome C (mg/g)
15% NIPAAm	25	0.69	1.33
15% NIPAAm/AAm (85:15)		0.59	1.15
15% NIPAAm/AAm (80:20)		0.54	1.52
30% NIPAAm/AAm (85:15)		0.69	1.69
30% NIPAAm/AAm (80:20)		0.67	1.40
15% NIPAAm (100:0)	37	0.34	0.78
15% NIPAAm/AAm (85:15)		0.65	1.00
15% NIPAAm/AAm (80:20)		0.47	2.16
30% NIPAAm/AAm (85:15)		0.69	2.75
30% NIPAAm/AAm (80:20)		0.55	2.51

Fig. 11 presents a microstructured hydrogel loaded with vitamin B₁₂ at 25 °C, during the release process.



Fig. 11. Hydrogel NIPAAm/DMA (80:20) microstructured with 15 % MG NIPAAm/AAm (85:15), loaded with vitamin B₁₂, a different sampling times during the release process, a) a time 0 at 25 °C, b) 1 hour at 25 °C, c) at the end of the first cycle at 42 °C, d) at the end of the release.

The release of Vitamin B₁₂ (1335 Da) was performed by oscillating the temperature between 25 °C and 42 °C. Fig. 12a shows about 70% release in the first hour at 25 °C for all microstructured hydrogels with only slight peak on rate at 42 °C (Figure 12b) for the microstructured hydrogels with 30% MG's. Almost complete release is observed in the first temperature cycle.

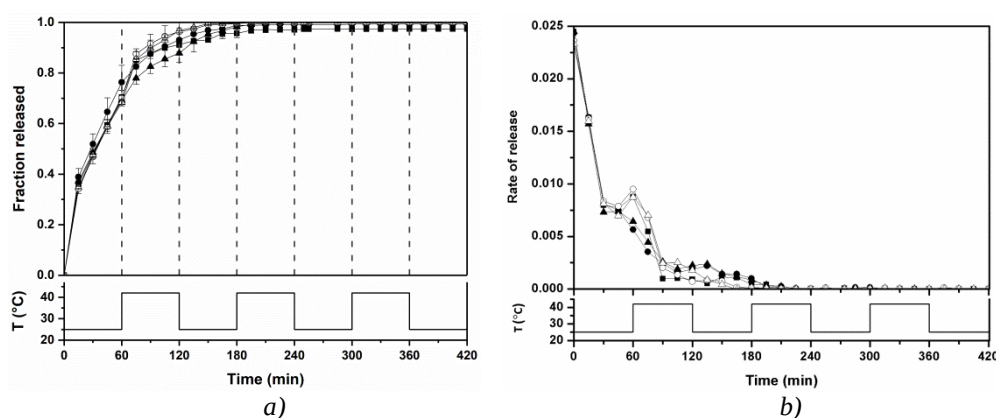


Fig. 12. a) Releasing vitamin B₁₂ in cycles of temperature 25 and 42 °C, and b) rate of release (mg/min) normalized by drug loading, for hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○) and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (Δ).

On the other release study temperature was cycled from 37 to 42 °C (Figure 13a) with similar results to the previous one, with a high proportion of solute released at 37 °C, but without change on rate at 42 °C (Fig. 13b); by contrast, there is a small increase of rate when temperature is decreased back at 37 °C and the hydrogels partially reswells. The slower release occurs for the hydrogel containing 15% MG NIPAAm taking three complete cycles to reach 100% release. This is the microstructured hydrogel with the lowest swelling according to the previous figures.

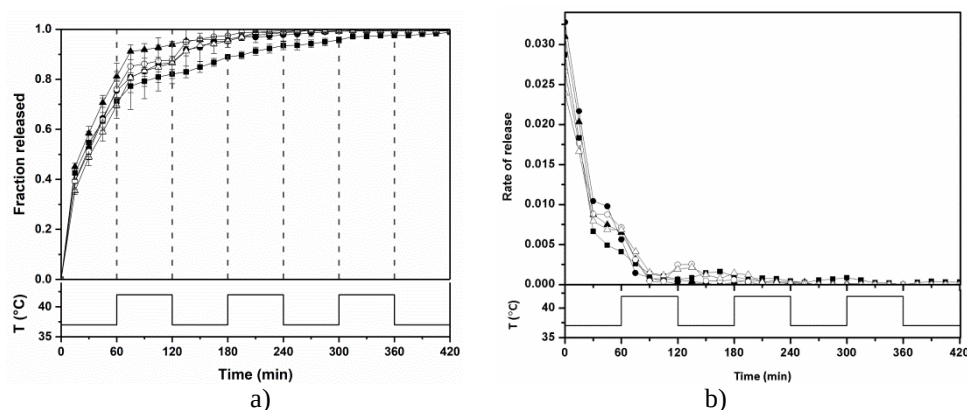


Fig. 13 **a)** Releasing vitamin B₁₂ in cycles of temperature 37 and 42 °C, and **b)** rate of release (mg/min) normalized by drug loading for hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○) and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (Δ).

Fig. 14a shows the release of cytochrome C (12,000Da) in temperature cycles of 25 °C to 42 °C. The microstructured hydrogels show a release of around 40% in the first hour. However, in this case, rate of release increases with each change of temperature, either increase to 42 °C or decrease to 25 °C (Figure 14b). This is, the rate of release increases when the hydrogels shrinks and expels water, but also when the hydrogel re-swells and allows diffusion of the solute. The hydrogel with the better temperature controlled release is the one containing 15% MG NIPAAm/AAm (85:15).

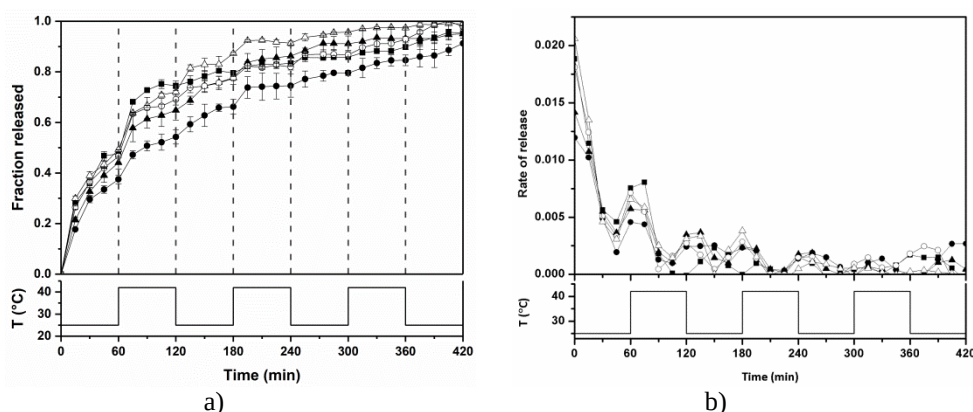


Fig. 14 **a)** Releasing cytochrome C in cycles of temperature 25 °C and 42 °C and **b)** rate of release (mg/min) normalized by drug loading for hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○) and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (Δ).

In Fig. 15a shows the release in cycles of temperature from 37 °C to 42 °C, the hydrogel with 15% NIPAAm shows a rapid release of 70% in the first hour (Figure 15b). In this case the

microparticles are in the shrunk state, while the hydrogels are partially swollen, which explains the fast release of the solute through the nanopores created by the shrinking of the MG's. The hydrogels with 15% and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) also present a high release (60%) in the first hour and a continuous release after that, independently of temperature. The hydrogels of 15% and 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) show a release of only 20% in the first hour at 37 °C. At this temperature the MG's are swollen (Figure 3) and block the diffusion of cytochrome C. The hydrogel containing 30% MG presented an increase in the rate of release of each cycle at 42 °C, indicating positive control release for at least two temperature cycles. The rest of the hydrogels presented a continuous release. All hydrogels need the 3 cycles to achieve complete release.

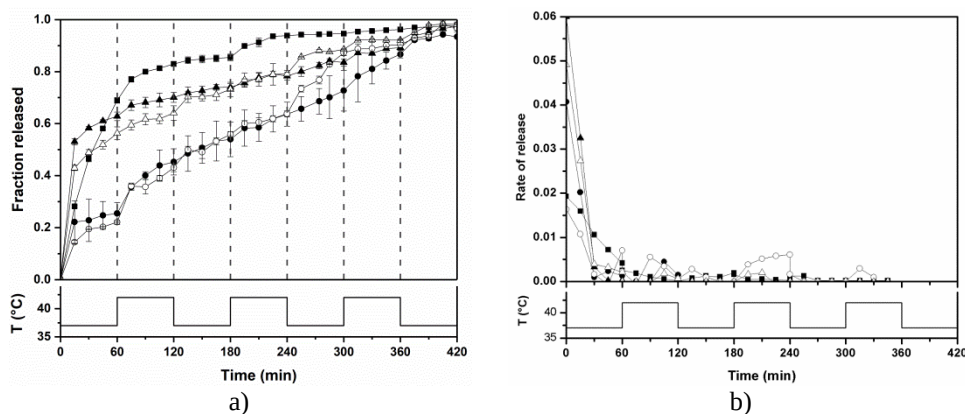


Fig. 15 **a)** Releasing cytochrome C in cycles of temperature 37 and 42 °C and **b)** rate of release (mg/min) normalized by drug loading for hydrogels NIPAAm/DMA (80:20) with: 15% MG NIPAAm (■), 15% MG NIPAAm/AAm (85:15) (●), 15% MG NIPAAm/AAm (80:20) (▲), 30% MG NIPAAm/AAm (85:15) (○) and 30% MG NIPAAm/AAm (80:20) (Δ).

4. Conclusions

Nano and microstructured NIPAAm hydrogels have demonstrated interesting properties such as fast temperature response and improved mechanical properties. Nevertheless, to our knowledge, there are not studies tuning the Ttr of both the nano/microgels and hydrogels, to achieve positive temperature control with these materials. Most studies reported on nanostructured hydrogels use NIPAAm nanoparticles prepared by inverse emulsion methods which requires organic solvents as the continuous media. In this case we use a simple and fast dispersion polymerization method using water as dispersion medium. In this study we demonstrated that it possible to modulate the Ttr of microstructured NIPAAm based hydrogels, above the body temperature, by copolymerizing with DMA or AAm. The materials present fast response to temperature from 37 °C to 42 °C. However, there is considerable shrinking of the copolymeric hydrogels at 37 °C, due to the continuity of the swelling transition, and for instance the magnitude of the swelling change between 37 °C and 42 °C is smaller than the swelling change between 25 °C and 42 °C. The swelling-deswelling cycles with changes of temperature from below and above the Ttr are reproducible to due to the fast response of the materials.

Release studies show fast release of low molecular weight solutes (vitamin B₁₂), with practically no temperature control for the microstructures hydrogels studied. On the other hand there is some temperature control for the release of higher molecular weight molecules (cytochrome C) with the hydrogels containing MG's with Ttr above 37 °C.

The results indicate that, even when some control of the release can be obtained, there is still the need to develop materials with a discontinuous swollen-unswollen transition above the normal body temperature for applications on the temperature sensitive, positive control release of macromolecules.

Acknowledgments

Work supported by Funding for New Full Time Professor PRODEP 2016 (UABC-PTC-620), 19th Call to Support Research Projects UABC, CONACyT (Scholarship number 216073), and SEP-CONACyT.

The technical support in STEM and SEM by Dr. I. A. Rivero (Instituto Tecnológico de Tijuana) is gratefully acknowledged. The authors are indebted to Dr. J. M. Del Valle for proofreading the paper.

References

- [1] S.C. Lee, I.K. Kwon, K. Park, *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 17 (2013).
- [2] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E.J. Suuronen, Z. Zhong, *Biomaterials* **35**, 4969 (2014).
- [3] L. Weng, A. Gouldstone, Y. Wu, W. Chen, *Biomaterials* **29**, 2153 (2008).
- [4] A. Navaei, D. Truong, J. Heffernan, J. Cutts, D. Brafman, R.W. Sirianni, B. Vernon, M. Nikkhah, *Acta Biomaterialia* **32**, 10 (2016).
- [5] M. Radecki, J. Spěvák, A. Zhigunov, Z. Sedláková, L. Hanyková, *European Polymer Journal* **68**, 68 (2015).
- [6] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, *European Polymer Journal* **65**, 252 (2015).
- [7] M.A. Haque, T. Kurokawa, J.P. Gong, *Polymer* **53**, 1805 (2012).
- [8] E.S. Dragan, *Chemical Engineering Journal* **243**, 572 (2014).
- [9] B. Wang, X. Wu, J. Li, X. Hao, J. Lin, D. Cheng, Y. Lu, *Polymers* **8**(4), 110 (2016).
- [10] G. Fundueanu, M. Constantin, F. Bortolotti, R. Cortesi, P. Ascenzi, E. Menegatti, *European Polymer Journal* **43**, 3500 (2007).
- [11] H. Zhang, Y. Zhai, J. Wang, G. Zhai, *Materials Science and Engineering C* **60**, 560 (2016).
- [12] N. do Nascimento Marques, B.L.B. de Lima, R. de Carvalho Balaban, *Macromolecular Symposia* **367**, 126 (2016).
- [13] M.A. Ward, T.K. Georgiou, *Polymers* **3**, 1215 (2011).
- [14] C. Gao, J. Ren, C. Zhao, W. Kong, Q. Dai, Q. Chen, C. Liu, R. Sun, *Carbohydrate Polymers* **151**, 189 (2016).
- [15] C.H. Hofmann, S. Grobelny, M. Erkamp, R. Winter, W. Richtering, *Polymer* **55**, 2000 (2014).
- [16] X.Z. Zhang, R.X. Zhuo, *Langmuir* **17**, 12 (2001).
- [17] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, *Journal Controlled Release* **190**, 254 (2014).
- [18] S. Belali, A.R. Karimi, M. Hadizadeh, *Polymer* **109**, 93 (2017).
- [19] L. Klouda, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **97**, 338 (2015).
- [20] G. Fundueanu, M. Constantin, S. Bucatariu, P. Ascenzi, *Polymer* **110**, 117 (2017).
- [21] A. Gandhi, A. Paul, S.O. Sen, K.K. Sen, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **10**, 99 (2015).
- [22] S. Tang, R. Bhandari, S.P. Delaney, E.J. Munson, T.D. Dziubla, J.Z. Hilt, *Mater. Today Commun.* **10**, 46 (2017).
- [23] M.A. Haq, Y. Su, D. Wang, *Materials Science and Engineering C* **70**(1), 842 (2017).
- [24] J.C. Yeh, H.H. Yang, Y.T. Hsu, C.M. Su, T.H. Lee, S.L. Lou, *Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **421**, 1 (2013).
- [25] A.M. Ponce, Z. Vujaskovic, F. Yuan, D. Needham, M.W. Dewhirst, *International Journal of Hyperthermia* **22**(3), 205 (2006).
- [26] W. Xiong, W. Wang, Y. Wang, Y. Zhao, H. Chen, H. Xu, X. Yang, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **84**, 447 (2011).
- [27] K. Yasuda, J.P. Gong, Y. Katsuyama, A. Nakayama, Y. Tanabe, E. Kondo, M. Ueno, Y. Osada, *Biomaterials* **26**, 4468 (2005).
- [28] K. Haraguchi, H.-J. Li, Y. Xu, G. Li, *Polymer* **96**, 94 (2016).
- [29] X. Zhang, D. Wu, C.C. Chu, *Biomaterials* **25**, 4719 (2004).
- [30] L.-W. Xia, R. Xie, X.-J. Ju, W. Wang, Q. Chen, L.-Y. Chu, *Nature Communications*

- 4**, 2226 (2013).
- [31] V.V.A. Fernandez, N. Tepale, J.C. Sanchez-Diaz, E. Mendizabal, J.E. Puig, J.F.A. Soltero, *Colloid Polymer Science* **284**, 387 (2006).
 - [32] K. Palomino, K.A. Suarez-Meraz, A. Serrano-Medina, A. Olivas, E.C. Samano, J.M. Cornejo-Bravo *Journal Polymer Research* **22**, 199 (2015).
 - [33] J.A. Hulse, S.M. Rosenthal, L. Cuttler, S.L. Kaplan, M.M. Grumbach, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **63**, 872 (1986).
 - [34] C.S. Tam, J.N.M. Heersche, T.M. Murray, J.A. Parsons, *Endocrinology* **110**(2), 506 (1982).
 - [35] R. E. Klabunde, S.E. Burke, J. Henkin, *Thrombosis Research* **58**, 511 (1990).
 - [36] H. Cho, Y.D. Yang, J. Lee, B. Lee, T. Kim, Y. Jang, S.K. Back, H.S. Na, B.D. Harfe, F. Wang, R. Raouf, J.N. Wood, U. Oh, *Nature Neuroscience* **15**, 1015 (2012).
 - [37] C. Obeso-Vera, J.M. Cornejo-Bravo, A. Serrano-Medina, A. Licea-Claverie, *Polymer Bulletin* **70**, 653 (2013).
 - [38] A. Serrano-Medina, J.M. Cornejo-Bravo, A. Licea-Claverie, *Journal Colloid Interface Science*. **369**, 82 (2012).
 - [39] R. Arshady, *Colloid Polymer Science* **270**, 717 (1992).
 - [40] H.G. Schild, *Prog. Polymer Science* **17**, 163 (1992).
 - [41] A. Morelli, M. Betti, D. Puppi, F. Chiellini, *Carbohydrate Polymers* **136**, 1108 (2016).
 - [42] M. Shibayama, M. Shibayama, S. Mizutani, S. Mizutani, S. Nomura, S. Nomura, *Macromolecules* **29**, 2019 (1996).
 - [43] R. Yoshida, K. Sakai, T. Okano, Y. Sakurai, *Journal of Biomaterials Science Polymer* **6**, 585 (1995).
 - [44] S. Zhou, B. Chu, *Journal of Physical Chemistry B*. **102**, 1364 (1998).
 - [45] A. Bin Imran, T. Seki, Y. Takeoka, *Polymer Journal* **42**, 839 (2010).