

Universidad Autónoma de Baja California

POSGRADO MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



“Síntesis de hidrogeles profármaco, como sistema dual de liberación de antihipertensivo y analgésico, para potenciales aplicaciones contra hemangiomas”

T E S I S

Para obtener el título de

Maestro en Ciencias

Por

Ángel David Medina Espinoza

Director de tesis

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla

Co-Director de tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaíno

Tijuana, Baja California, México a Enero de 2023

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.339
Tijuana, B.C., a 09 de diciembre del 2022

C. Ángel David Medina Espinoza
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente


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


Es propuesto, por los C. Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y
Dra. Kenia Palomino Vizcaino

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema "Síntesis de hidrogeles profármaco, como sistema dual de
liberación de antihipertensivo y analgésico, para potenciales aplicaciones
contra hemangiomas"

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

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



Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez
Sub-Directora



M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


Dra. Kenia Palomino Vizcaino
Co - Directora de Tesis


Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director de Tesis

ÍNDICE

Contenido	Página
Hoja de aprobación.....	2
Lista de figuras.....	6
Lista de tablas.....	8
Agradecimientos.....	9
Resumen.....	12
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	
I.1. Antecedentes.....	13
I.2. Hipótesis.....	16
I.3. Justificación.....	16
I.4. Objetivo general.....	17
I.5. Objetivos específicos.....	17
I.6. Marco teórico.....	18
CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL	
II.1. Síntesis y caracterización de monómero.....	39
II.1.1. Síntesis de monómero de ácido 2-metacrioloiloxibenzoico (MAOB).	41
II.1.2. Caracterización de monómero.	41
II.1.2.1. Cromatografía de capa fina.....	41
II.1.2.2. Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).	42
II.1.2.3. Resonancia Magnética nuclear de protón.	42
II.2. Preparación de hidrogeles de ácido 2-metacrioloiloxibenzoico (MAOB) – Propranolol al 2.5%.....	42

II.2.1. Preparación de hidrogeles entre placas de vidrio.	43
II.2.2. Caracterización por Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada.	43
II.3. Estudio de hinchamiento.	44
II.4. Estudio de hidrólisis – liberación.....	44
II.4.1. Cuantificación de fármacos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	44
II.4.1.1. Preparación de fase móvil (Solución A).	45
II.4.1.2. Preparación de fase móvil (Solución B).	45
II.4.1.3. Condiciones cromatográficas.	45
II.5. Estudio de viabilidad celular.	45
II.5.1. Crecimiento de líneas celulares.	46
II.5.2. Estudio de citotoxicidad (conteo de células).	46
II.5.3. Estudio de citotoxicidad (Actividad metabólica MTT).	47
II.6. Estudio de evaluación de actividad antimicrobiana.	47
II.6.1. Preparación de medio Müller-Hinton.	47
II.6.2. Preparación de agar Infusión Cerebro – Corazón (BHI).	47
II.6.3. Estudio de actividad antimicrobiana.	48

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

III.1. Síntesis y caracterización de monómero.	49
III.1.1. Síntesis de monómero de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico.	49
III.2. Caracterización de monómero de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico.	49
III.2.1. Cromatografía de capa fina.	49
III.2.2. Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).	50
III.2.3. Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ¹ H).	53

III.3. Preparación de hidrogeles de ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (MAOB) – Propranolol.	53
III.3.1. Caracterización por Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).	55
III.3.2. Comparación de espectros de infrarrojo de monómero de MAOB, propranolol e hidrogeles de MAOB-Propranolol.	56
III.4. Estudio de hinchamiento.	58
III.4.1. Estudio de hinchamiento a 37°C.	59
III.4.2. Estudio de hinchamiento a 25°C.	60
III.4.3. Comparativo de prueba de hinchamiento en diferentes condiciones.	61
III.5. Estudio de hidrólisis – liberación y cuantificación de fármaco a través de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).	62
III.5.1. Liberación a pH 7.4.	63
III.5.2. Liberación a pH 5.5.	67
III.6. Estudio de viabilidad celular.	74
III.7. Estudio de evaluación de actividad antimicrobiana.	78
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	79
CAPÍTULO V. ANEXOS	82
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
1. Polimerización de la molécula de estireno	18
2. Tipos de estructura que presentan los polímeros	21
3. Diferencias entre un entrecruzamiento químico y físico	24
4. Efecto producido de un estímulo sobre un hidrogel	24
5. Esquema de la anatomía del ojo	26
6. Infecciones vaginales más comunes	27
7. Apósito a base de hidrogel para el tratamiento de quemaduras	29
8. Estructura de propranolol	31
9. Estructura de ácido salicílico	31
10. Ejemplo representativo de espectroscopia de infrarrojo	33
11. Esquema de los principales componentes de un espectrómetro de RMN	34
12. Fundamento del análisis termogravimétrico	35
13. Ejemplo de gráfico obtenido después de un estudio de termogravimetría	36
14. Fibras de Lycra vistas por SEM	36
15. Esquema de un microscopio electrónico de barrido	37
16. Fundamento de la cromatografía de líquidos de alta resolución	38
17. Ejemplo de un cromatograma obtenido a través de HPLC	39
18. Síntesis de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico	40
19. Resultado de cromatografía en capa fina	50
20. Espectro de infrarrojo de monómero de MAOB	52
21. Espectro de RMN- ¹ H del monómero de MAOB	53
22. Esquema representativo de síntesis de hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%.	54
23. Espectro de infrarrojo de hidrogel de MAOB – Propranolol 0.5%	55
24. Espectro de infrarrojo de estándar de propranolol	56

25. Gráfico comparativo de MAOB, propranolol e Hidrogeles de MAOB – Propranolol 0.5%	57
26. Gráfico comparativo de grado de hinchamiento con respecto al tiempo en los diferentes pH's a 37°C	59
27. Gráfico comparativo de grado de hinchamiento con respecto al tiempo en los diferentes pH's a 25°C	60
28. Gráfico comparativo de grado de hinchamiento con respecto a las variaciones de pH y temperatura	61
29. Esquema representativo del proceso de hidrólisis – liberación de hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%.	63
30. Gráfico de cinética de liberación para el fármaco ácido salicílico a pH 7.4.	64
31. Gráfico de cinética de liberación del fármaco propranolol a pH 7.4.	65
32. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de los fármacos ácido salicílico y propranolol.	66
33. Gráfico de cinética de liberación para el fármaco ácido salicílico (pH 5.5).	67
34. Gráfico de cinética de liberación para el fármaco propranolol (pH 5.5).	68
35. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de los fármacos ácido salicílico y propranolol pH 5.5.	69
36. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de ácido salicílico a pH 7.4 y pH 5.5.	70
37. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de propranolol a pH 7.4 y pH 5.5.	71
38. Estándar de ácido salicílico.	72
39. Estándar de propranolol.	72
40. Estándar cargado con ácido salicílico y propranolol.	73
41. Cromatograma de muestra de liberación a pH 7.4, señal analítica correspondiente a ácido salicílico.	73

42. Cromatograma de muestra de liberación a pH 7.4, señal analítica correspondiente a propranolol.	74
43. Gráfico de viabilidad celular, en células HeLa sometido a los diferentes hidrogeles sintetizados.	75
44. Gráfico de viabilidad celular, en Fibroblastos 3T3 sometido a los diferentes hidrogeles sintetizados.	76
45. Gráfico de viabilidad celular, en células de melanoma sometido a los diferentes hidrogeles sintetizados.	77
46. Monómero de ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (MAOB).	82
47. Hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%.	82
48. Hidrogel hinchamiento pH 7.4 a 37°C (a). Hidrogel hinchamiento pH 5.5 a 37°C (b).	83
49. Hidrogel hinchamiento pH 7.4 a 25°C (a). Hidrogel hinchamiento pH 5.5 a 25°C (b).	83
50. Hidrogel liberación pH 7.4 (a). Hidrogel liberación pH 5.5 (b).	84
51. Curva de calibración de ácido salicílico a 280 nm.	84
52. Curva de calibración de propranolol a 235 nm.	85

LISTA DE TABLAS

- I. **Tabla I.** Grupos funcionales característicos en el monómero de MAOB.
- II. **Tabla II.** Absorbancias obtenidas después de 24 horas de incubación, para *E.coli* y *S.aureus*.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer un especial y afectuoso agradecimiento a mis padres Miguel y Guillermina, los cuales nunca dejaron de luchar y esforzarse por verme terminar mis metas, por todo el apoyo que siempre recibí y sigo recibiendo, no solo económico sino también por todos esos valores, enseñanzas y consejos que me han brindado todos estos años, por ser unos excelentes padres y buscar por diferentes medios lo mejor para mis hermanos y para mí, por siempre guiarme por un camino de bien a pesar de todas las dificultades que tuvimos que enfrentar, y lo más importante por siempre darme su amor y confianza incondicional, que siempre fue y será mi motivación más grande ya que sin la ayuda de ellos no hubiera logrado una meta más en vida. A mis hermanos Jesús y Yareli, quienes siempre han sido mis compañeros y amigos desde que tengo memoria y espero que siempre siga siendo así, les agradezco todo ese cariño que siempre me han demostrado, por todos esos momentos inolvidables que hemos pasado y pasaremos, siempre estaremos juntos para seguir afrontando todos los desafíos que se nos pongan enfrente.

A Hatziri Peña quien fue y sigue siendo una persona fundamental para mí, ya que siempre me ha apoyado para seguir adelante, por estar siempre conmigo en los momentos más felices y difíciles de nuestra vida juntos, motivándome a ser una mejor persona tanto profesional como humana, le agradezco todos esos consejos que me da día a día, por darme esa confianza y creer siempre en mis capacidades como profesional, y siempre dándome ese valor para crecer cada día, y sobre todo el amor que me ha brindado estos años. Además de acompañarme y ayudarme incondicionalmente en todo momento dentro y fuera del laboratorio.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, por siempre brindarme su apoyo y proveer los equipos necesarios para la realización y culminación de mi maestría durante estos dos años.

Agradezco al Dr. Hector Alfonso Magaña Badilla por aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por compartir su experiencia y conocimiento en el área de investigación, por haberme motivado en todo momento para llevar a cabo el presente trabajo, por todos sus consejos y enseñanzas, por todo su apoyo, comprensión y paciencia durante estos dos años.

Agradezco a la Dra. Kenia Palomino Vizcaino por compartir su amplio conocimiento en la generación de hidrogeles y pruebas de viabilidad celular, por sus consejos, por su apoyo y disposición para desarrollar y culminar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proveerme de la beca con número de CVU de 1064236, la cual financió el presente trabajo durante los dos años de investigación, a la convocatoria de investigación de ciencia básica CONACYT 2017 – 2018 del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CB2017-2018 (proyecto A1-s-29789).

RESUMEN

El presente trabajo de tesis incluye la preparación de hidrogeles polimérico, con cargado *in situ* de un polímero profármaco a partir del monómero de ácido salicílico, y un β -bloqueador (propranolol), con el fin de evaluar su comportamiento al someterlo a diferentes estudios, tales como la respuesta a estímulos fisiológicos de pH y temperatura, su actividad antimicrobiana y estudio de viabilidad celular. Se realizó la síntesis y caracterización del monómero por cromatografía de capa fina, FTIR-ATR y resonancia magnética nuclear de protón. Se prepararon hidrogeles en forma de lámina, esto con ayuda de moldes de placa de vidrio y espaciadores de plástico, mediante polimerización vía radicales libres en condiciones anhidras bajo condiciones de atmosfera inerte de nitrógeno, utilizando dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) como agente entrecruzante, azobisisobutinitrilo (AIBN) como iniciador y dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente. Se estudió el grado de hinchamiento del hidrogel sintetizado con respecto a variaciones de pH (5.5 y 7.4), obteniéndose el grado de hinchamiento por medio de cálculo gravimétrico cuyos resultados muestran que los hidrogeles presentan una afinidad mayor a pH's mayores (7.4) el cual muestra una fase de transición mayor de hinchamiento, mientras que a pH menores (5.5) se presenta una fase de transición menor de hinchamiento. Se realizó un estudio de hidrólisis – liberación *in vitro*, se evaluó la cinética de liberación durante 72 horas a pH 5.5 y 7.4, a pH 7.4 se obtuvo una mayor cantidad de miligramos liberados en ambos fármacos (ácido salicílico y propranolol), mientras que a pH 5.5 se observa una liberación menor de ambos fármacos, adicionalmete se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución para la identificación de ambos principios activos, corroborando un correcto cargado *in situ*. El estudio de actividad antimicrobiana mostro una inhibición casi nula en ambos microorganismos evaluados (*E. coli* y *S. aureus*), indicando que los hidrogeles sintetizados presentan una baja capacidad inhibitoria ante microorganismos gram positivos y gram negativos. Con respecto al estudio de viabilidad celular, los hidrogeles mostraron la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas (células de HeLa y células de melanoma),

mientras que en células no cancerígenas (células de fibroblastos 3t3) se demuestra una baja toxicidad de los hidrogeles.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES.

Los hemangiomas infantiles (HI) o comúnmente conocidos como “marcas de nacimiento” es un tumor vascular congénito no canceroso que se generan a causa del crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Esta enfermedad, como su nombre lo dice, afecta principalmente a pacientes infantiles, la incidencia de esta enfermedad se estima entre 5% al 10% de la población infantil. Teniendo una incidencia mayor (20% - 30%) en recién nacidos con bajo peso al nacer.¹ Los HI son más prevalentes en niños caucásicos y son tres veces más comunes en niñas que en niños. Esta enfermedad puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, sin embargo, la región de la cabeza y cuello es la zona más frecuentemente afectada (60%), seguida del tronco (25%) y las extremidades (15%). Los HI pasan por una fase de proliferación rápida en los primeros meses de vida, seguida de una etapa de involución espontánea, con resolución lenta que abarca años. Cabe mencionar que estos tumores generalmente no se presentan al momento de nacer, si no que estos van evolucionando en las primeras semanas de vida. Estudios han revelado que existen otros factores que predisponen su aparición como anomalías placentarias y edad materna avanzada^{1,2}. Los tratamientos más comunes para esta enfermedad son, medicamentos (esteroides), laser y cirugía (en caso de requerirlo). En México se tienen pocas opciones de tratamiento de hemangiomas, por lo cual en algunos casos se opta por importar medicamentos de Europa generando un costo promedio de 150 dólares mensuales³.

El 90% de los hemangiomas desaparecen con el paso de los años (aproximadamente a la edad de 9 años), y en algunos casos se opta por no dar algún tipo de tratamiento, esto dependerá de la progresión y proliferación del hemangioma, en estos casos el paciente no sufre complicaciones durante el

proceso¹. Sin embargo el 10% de los hemangiomas pueden presentar complicaciones en el tiempo que prevalezcan, tales como producir ulceraciones en el área afecta, y en casos más graves se puede llegar a ser mortal debido a la ubicación donde se presenta, es importante tener en monitoreo constante para a la primera señal de complicación se empieza con un tratamiento individual adecuado⁴.

Dentro de las complicaciones de los hemangiomas, se puede presentar el hemangioma de tipo verrugoso, el cual se define como una malformación vascular congénita localizada, este tipo de hemangioma es poco frecuente. Este hemangioma se presenta como una lesión en la piel de color rojizo azulado en sus primeros estadios, con el tiempo este adquiere una superficie verrugosa como mecanismo de protección. Al formarse esta superficie verrugosa, se hace más difícil su tratamiento, ya que al presentar dicha superficie imposibilita el mecanismo de acción de los tratamientos tópicos descritos para los hemangiomas infantiles, además de no poder realizar una cirugía para removerlo debido a que se puede llegar a presentar un sangrado mayor y poner en riesgo la vida del paciente. Este tipo de hemangioma puede ser confundido con otras enfermedades de la piel como un angioqueratoma, un linfangioma circunscrito, un nevus epidérmico verrucoso o incluso un melanoma maligno, por lo cual se deben realizar estudios específicos para descartar o detectar su presencia.⁵

En los últimos años se ha buscado desarrollar distintos medicamentos que ayuden al tratamiento de los hemangiomas, el descubrimiento más significativo fue el uso de propranolol, ya que se demostró que, al utilizarlo, este presenta una alta eficacia contra los hemangiomas. En el año 2014 la FDA aprobó una solución oral a base de clorhidrato de propranolol como tratamiento de primera línea contra los hemangiomas infantiles.¹

La administración convencional de fármacos implica la administración repetida de un compuesto activo para mantener niveles terapéuticos en el cuerpo, esto puede llegar a comprometer la eficacia del tratamiento y puede desencadenar una serie de efectos secundarios debido a las dosis altas⁶. Por lo cual la investigación

farmacéutica se ha inclinado en desarrollar nuevas variantes en cuanto a la administración y liberación de fármacos, esto con el fin de controlar y dirigir la liberación en sitios específicos de acción, ya sea mejorando la forma farmacéutica o el mecanismo de acción por el cual se libera el fármaco. Esto con la finalidad de mejorar la eficacia y reducir los tiempos de tratamientos de los pacientes, además de aumentar los niveles de fármaco en sangre, reducir dosis y brindar nuevas alternativas de tratamientos frente a diversas enfermedades ^{7,8}.

Se han estudiado diversos sistemas de liberación, de los cuales destaca la síntesis de materiales inteligentes, denominados así por su capacidad de responder ante cambios externos, dichos materiales presentan cambios a nivel físico y/o químico en respuesta a condiciones fisiológicas, generando una gran expectativa para una posible implementación en sistemas farmacológicos de liberación controlada y dirigida ^{8,9}.

Dentro de la investigación científica, se ha propuesto y aplicado la utilización de formulaciones tópicas a base de β -bloqueadores para el tratamiento de hemangiomas infantiles, tales como el propranolol, timolol o una combinación de ambos fármacos ¹⁰. Estas investigaciones han dado resultados positivos teniendo una recuperación total o parcial de los pacientes, la principal ventaja de usar una formulación tópica, es la concentración final de fármaco utilizado, ya que se reporta que con pequeñas cantidades de fármaco se obtiene una recuperación exitosa en la mayoría de los pacientes, las concentraciones varían con respecto al fármaco y a la condición del paciente, algunas de las formulaciones reportadas para timolol van del 0.5 al 1%, mientras que para propranolol se reportan formulaciones desde el 1 al 2% ^{1,10,11}. Además otra gran ventaja es que al ser administrado por vía tópica se ha logrado disminuir los efectos secundarios reportados en formulaciones orales tales como alteración del sueño, hipotensión, bradicardia, alteraciones gastrointestinales, broncoespasmos, hipoglucemia, hipercalemia y acrocianosis¹¹. Una investigación actual, reporta la implementación de un gel tópico cargado con nanopropranolol al 0.5%, esto con el fin de facilitar y mejorar el tiempo de acción del fármaco, debido a que en la piel se encuentran

diferentes capaz, lo cual imposibilita la penetración de fármaco en la piel, obteniendo resultados positivos demostrando que se puede utilizar una dosis baja de propranolol para obtener los mismos o mejores resultados que con concentraciones más altas ¹.

I.2. HIPÓTESIS.

Sintetizar y desarrollar hidrogeles que posean un sistema dirigido de liberación dual de un analgésico y un antihipertensivo, podría brindar una alternativa como sistema inteligente a la respuesta de estímulos fisiológicos, generando una propuesta innovadora en la industria farmacéutica y una alternativa en el tratamiento de hemangiomas en pacientes infantiles.

I.3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran incidencia de hemangiomas en pacientes infantiles (10%), pocos tratamientos y costo elevado que algunos de ellos implican, se propone generar una alternativa a través de la síntesis de un hidrogel a partir de un polímero profármaco el cual incorpore un sistema dual de liberación de fármaco (analgésico y antihipertensivo) que en conjunto potencien el efecto farmacológico y ayuden a mejorar el tratamiento para esta enfermedad.

La liberación dual de los fármacos será a través de un sistema inteligente, el cual comience a través de estímulos fisiológicos (pH y temperatura) generando un sistema dirigido y así ayudar a la absorción de fármacos.

Dada la incidencia de esta enfermedad y a las pocas alternativas en el tratamiento farmacológico, generar una alternativa con un buen desempeño y a un costo accesible para la mayoría de las familias mexicanas y extranjeras, es un amplio mercado de oportunidad para utilizar el hidrogel.

I.4. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar hidrogeles de tipo salicilato mediante polimerización vía radicales libres, su caracterización, estudio como sistema dual para cargado-liberación de fármaco analgésico y antihipertensivo, bajo condiciones fisiológicas de pH-temperatura, y su evaluación biológica de viabilidad celular y antimicrobiana.

I.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I.5.1. Sintetizar el monómero ácido 2-metacrioloiloxibenzoico (MAOB) y caracterización por espectrofotometría de infrarrojo (FTIR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN-H).

I.5.2. Sintetizar hidrogeles de tipo salicilato a partir del monómero, el entrecruzaste (dimetacrilato de etilenglicol), iniciador (Azobisisobutinitrilo) con cargado *in situ* de propranolol.

I.5.4. Caracterizar hidrogel por espectrofotometría de Infrarrojo (FTIR).

I.5.5. Estudiar el proceso de hinchamiento con respecto a las variaciones de pH.

I.5.6. Estudiar el proceso de hidrólisis-liberación de fármacos y cuantificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

I.5.7. Evaluar la viabilidad celular en células cancerígenas (HeLa, melanoma B16F10) y no cancerígenas (fibroblasto 3t3).

I.5.8. Realizar pruebas de actividad antimicrobiana del sistema desarrollado por método de placa vertida con extensión de superficie.

I.6. MARCO TEÓRICO

I.6.1. Monómeros

Un monómero se puede definir como una molécula de bajo peso molecular el cual tiene la facilidad de unirse a otros monómeros mediante de enlaces covalentes, para dar lugar a moléculas de mayor tamaño denominadas polímeros mediante un proceso denominado polimerización (**Figura 1.**)¹².

La clasificación de los monómeros se pueda dar de diversas maneras, están dependerán del tipo de polímero que puedan llegar a formar, en general los monómeros se pueden clasificar en dos grupos, monómeros naturales y monómeros sintéticos. Los monómeros naturales, como su nombre lo dice, son todos aquellos que pueden encontrar de manera natural y no necesitan de un proceso químico para generarlos, algunos de los más conocidos son la glucosa, el almidón y la celulosa, dentro de esta clasificación están los aminoácidos (monómeros de las proteínas), nucleótidos (monómeros de los ácidos nucleicos), entre otros. Los monómeros sintéticos son aquellos que se obtienen mediante reacciones químicas, algunos ejemplos de monómeros sintéticos son el eteno, cloruro de vinilo, acrilamida y el polietileno¹³.

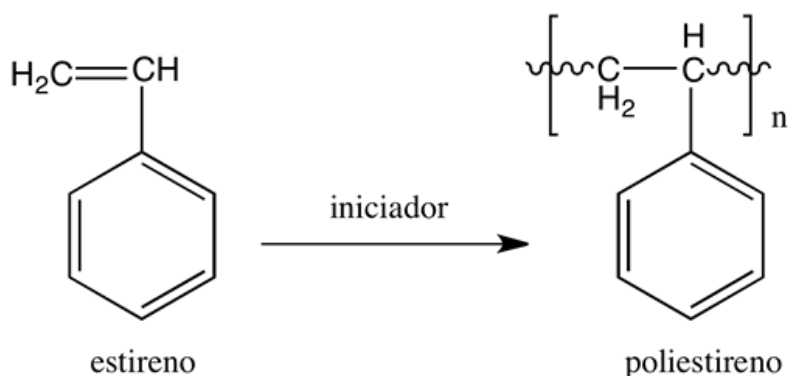


Figura 1. Polimerización de la molécula de estireno (Textos científicos, 2013).

I.6.2. Polímeros

Un polímero se define como una macromolécula formada a partir de la una unión repetida de una o varias moléculas por enlaces covalentes denominadas monómeros. Los monómeros están formados fundamentalmente por átomos de carbono y pueden contener grupos laterales o radicales con uno o más átomos. Los polímeros se obtienen mediante un proceso denominado polimerización, en este se produce la reacción de miles de monómeros generando una larga cadena macromolecular ¹³.

Los polímeros pueden clasificarse de diferente manera, al igual que los monómeros, los polímeros se clasifican en naturales y sintéticos. Los polímeros naturales son todos aquellos que son generados por organismos vivos sin sufrir alguna modificación, como las proteínas utilizadas por las arañas para tejer su telaraña, otros ejemplos son los polisacáridos y el caucho natural. Los polímeros sintéticos son aquellos obtenidos mediante métodos químicos en ambientes controlados para dar origen a una cadena larga de monómeros. Otra manera de clasificar los polímeros es por la estructura que presentan, las tres principales son, estructura lineal (se repite el mismo tipo de unión), ramificada (presencia de cadenas laterales unidas a la cadena principal) y entrecruzada (unión de dos cadenas vecinas mediante un tipo de enlace) (**Figura 2**) ¹⁴.

La administración convencional de fármacos implica la administración repetida de un compuesto activo para mantener niveles terapéuticos en el cuerpo, esto puede comprometer la eficacia del tratamiento y puede provocar efectos secundarios debido a las dosis altas ⁵. Por lo cual la investigación farmacéutica en los últimos años se ha inclinado a desarrollar nuevas variantes en la liberación de fármacos buscando la manera de controlar y dirigir su liberación en sitios específicos de acción, ya sea mejorando la forma farmacéutica o el mecanismo de acción por el cual se liberara el fármaco, esto con el fin de mejorar la eficacia y reducir los tiempos de tratamiento de los pacientes, además de aumentar los niveles de fármaco en sangre, reducir dosis y brindar nuevas alternativas de tratamientos frente a diversas enfermedades ^{8,15}.

Dentro de la industria farmacéutica la utilización de polímeros ha tenido un gran auge, debido a que con estos se pueden generar materiales inteligentes los cuales presentan características ideales para una mejor liberación de fármaco. Desde el siglo XX se ha estudiado la funcionalidad que podrían presentar algunos polímeros, ya que en su mayoría tienden a presentar características que en conjunto indican que la utilización de estructuras poliméricas como sistema inteligente de administración y liberación de fármaco es factible. Sin embargo se han encontrado limitaciones en el uso de polímeros como sistema de liberación de fármacos, ya que algunos de los polímeros estudiados presentan una alta toxicidad en células, haciendo imposible la utilización de algunos de ellos ^{6,16}.

A raíz de estas limitaciones se empezaron a realizar estudios con polímeros biodegradables y biocompatibles los cuales presentan las mismas características, pero con la diferencia de no presentar toxicidad ante las células⁶. La utilización de polímeros naturales como proteínas y carbohidratos sobre polímeros sintéticos como precursores primarios para desarrollar materiales inteligentes ha sido de gran interés. Cuando se utilizan materiales naturales para la síntesis de estructuras poliméricas, están presentes dos principales ventajas las cuales las hacen idóneas para su utilización, una de ellas es una alta biocompatibilidad con el cuerpo, evitando algún tipo de rechazo, además presentan una baja toxicidad a nivel celular, ya que en varios estudios realizados, se demuestra que al incluir polímeros naturales la viabilidad celular se aumenta considerablemente ¹⁷.

En los últimos años se han utilizado diferentes polímeros tanto naturales y sintéticos para generar sistemas inteligentes de liberación de fármacos, debido a las propiedades fisicoquímicas que puedan llegar a presentar. Una de las propiedades más relevantes de los polímeros es la reacción ante estímulos externos como pH y temperatura, lo cual ha generado diversos estudios de hidrolisis-liberación de fármacos a nivel mundial, dando resultados positivos, indicando que la utilización de polímeros es factible. Dando lugar a la generación de los llamados polímeros profármacos ¹⁶.

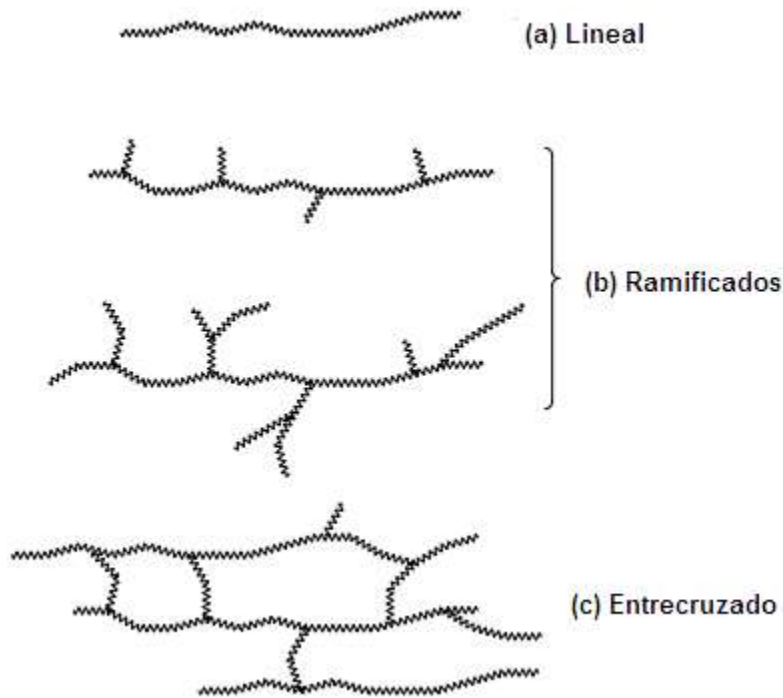


Figura 2. Tipos de estructura que presentan los polímeros (Carrasquera, 2004).

I.6.3. Polímeros profármacos

Para llegar a comprender o darle un significado al término polímero profármaco, primero se debe definir que es un profármaco. El término profármaco fue descrito por primera vez en 1958 por Adrian Albert, el cual lo define como un “producto inactivo que puede convertirse en activo mediante una reacción metabólica”, en términos farmacológicos se puede interpretar que los profármacos son agentes terapéuticos que no presentan alguna actividad farmacológica en su estado normal, pero al estar en contacto con un estímulo estos se transforman y desencadenan un efecto farmacológico ¹⁸.

Los profármacos se clasifican en dos tipos, uno de ellos son “profármacos unidos a transportadores”, estos deben cumplir una serie de requisitos los cuales los hacen ser efectivos, algunos de estos requisitos son:

- La unión entre el fármaco y el transportador debe estar dada mediante un enlace covalente.
- El profármaco diseñado no debe presentar actividad farmacológica.
- El enlace debe romperse una vez que esté dentro del organismo.
- El profármaco no debe de presentar toxicidad.
- La liberación de fármaco debe ser rápida en el lugar de acción para evitar algún metabolismo alterno.

Otro tipo de profármacos los denominados “profármacos bioprecusores”, estos resultan de la modificación de la estructura molecular del fármaco y necesitan de una activación metabólica por parte del organismo (oxidación o reducción) para que este se presente en su forma activa, un ejemplo muy conocido de este tipo de profármaco es el omeprazol ¹⁸.

Tomando en cuenta lo comentado anteriormente, un polímero profármaco se puede definir como “un material con propiedades poliméricas capaz de fungir como una matriz transportadora de fármacos, que al entrar en contacto con un estímulo fisiológico liberara el fármaco en el sitio de acción ideal”, facilitando su proceso de liberación y absorción ¹⁹.

Por ejemplo, se ha estudiado previamente el profármaco polimérico de ácido salicílico, mejor conocido como poli(MAOB), dicho profármaco polimérico es sintetizado a través de su monómero de MAOB (ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico), el cual presenta diversas características, una de las más importantes es que gracias a su estructura puede ser cargado fácilmente en diversas matrices las cuales fungen como un medio transporte para generar una liberación dirigida. Como se comentó, este polímero tiene la ventaja de ser un profármaco, el cual al entrar en contacto con condiciones ideales entra en un proceso de hidrólisis liberando el ácido salicílico como producto, el cual puede ser utilizado como profiláctico para procesos inflamatorios y prevenir la colonización de bacterias en cirugías estéticas. Así mismo, dicho polímero se ha utilizado para cargar dispositivos médicos e implantes de senos (siliconas) ^{20,21}.

I.6.4. Hidrogeles

Dentro de los materiales poliméricos inteligentes se encuentran los hidrogeles se pueden definir como materiales poliméricos que presentan en su estructura redes tridimensionales formadas a partir de la unión de uno o más polímeros ⁶. Los hidrogeles al igual que los polímeros, se han sintetizado a partir de polímeros naturales o la combinación de polímeros sintéticos con naturales, estas síntesis reciben una atención mayor a nivel científico ya que los hidrogeles presentan una similitud muy alta con los tejidos vivos en términos de propiedades mecánicas, porosidad y alto contenido de agua. Estas características permiten que los hidrogeles se acomoden, almacenen y luego liberen diversas sustancias, lo que los convierten en materiales excelentes para una amplia gama de aplicaciones ²².

Los hidrogeles pueden clasificarse de diversas maneras, una de las clasificaciones más conocida es por el tipo de enlace que este puede llegar a presentar, ya que de este dependerá la estructura de la red tridimensional y la prevención de la disolución de las cadenas hidrofílicas ²³. Existen dos categorías en las cuales se pueden clasificar según su tipo de enlace (**Figura 3**):

- **Hidrogeles físicamente reticulados:** Los hidrogeles de este tipo experimentan una transición de su estructura tridimensional estable a una solución de polímero. Los enlaces de la estructura se forman a partir de fuerzas de atracción no covalentes entre las cadenas poliméricas, como los puentes de hidrogeno, interacciones hidrófobas y electrostáticas.
- **Hidrogeles químicamente reticulados:** Estos hidrogeles son generalmente más estables que los físicamente reticulados, debido a que su reticulación está dada por enlaces covalentes. La reticulación que presentan estos hidrogeles son permanentes, a menos que se les introduzcan intencionalmente enlaces químicos lábiles.

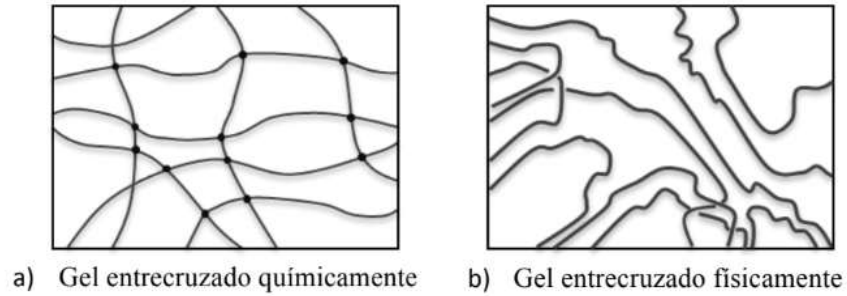


Figura 3. Diferencias entre un entrecruzamiento químico y físico (Escalona O, 2014).

También pueden clasificarse como hidrogeles estímulo-sensibles e hidrogeles estímulo –no sensibles. Los hidrogeles estímulo-no sensibles, son materiales que no presentan respuesta al estar expuesto a algún tipo de estímulo, estos simplemente se hinchan por la absorción de agua. Por otra parte, los hidrogeles estímulo sensibles han sido denominados como “materiales inteligentes”, ya que al estar en presencia de estímulos fisiológicos o algún otro estímulo, tales como la temperatura, el pH, luz y el campo eléctrico responden cambiando su grado de hinchamiento (**Figura 4**). La respuesta a los diferentes estímulos ya mencionados, dependerá del tipo de monómero o polímero utilizado al momento de sintetizarlo

24 .

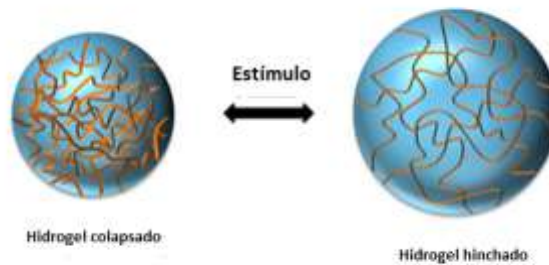


Figura 4. Efecto producido de un estímulo sobre un hidrogel (Qureshi D, 2019).

Los hidrogeles pueden llegar a tener una buena biocompatibilidad, una biodegradación deseable y una baja citotoxicidad en el cuerpo humano ⁷. Además, se ha demostrado que los hidrogeles al igual que los polímeros tienen la capacidad de presentar respuesta a estímulos físicos y químicos de los cuales destacan la temperatura, luz, pH y en algunos casos los campos magnéticos. Gracias a estas características los hidrogeles se han tomado una gran relevancia, y se han aplicado a diversos campos, como la industria farmacéutica, medicina, ingeniería de tejidos y cosméticos, ya que sus propiedades brindan nuevas alternativas en todas estas áreas ²⁵.

Gracias a estas características los hidrogeles se han estudiado desde hace dos décadas, centrándose principalmente en hidrogeles sensibles al pH. El uso de estos hidrogeles ha tenido una prevalencia a nivel farmacéutico, donde su principal uso ha sido la administración de fármacos debido a su capacidad de respuesta a los cambios de pH en situaciones corporales alteradas, así como en condiciones corporales normales ²⁵.

A nivel farmacéutico los hidrogeles han llamado la atención los últimos años, ya que gracias a sus propiedades y a su estructura porosa, estos pueden ser cargados fácilmente con algún fármaco de interés, y gracias a la capacidad de absorción de agua, estos garantizan la difusión útil del fármaco, además se ha demostrado que al utilizarlos como una matriz de transporte, se genera un sistema dirigido, ya que gracias a la respuesta a estímulos fisiológicos específicos su liberación se da en el sitio idóneo de acción. Cumpliendo así una de las metas principales en la medicina moderna, que es diseñar sistemas inteligentes de administración de fármacos o por sus siglas en inglés DDS (Drug Delivery Systems) ²⁶.

Sin embargo los hidrogeles suelen presentar algunas desventajas que limitan su uso, una de las desventajas más importantes es la limitación de fármacos que pueden ser cargados o transportados, debido a la polaridad o cargas iónicas que presentan algunos fármacos en su estructura. Además se ha reportado que algunos hidrogeles a pesar de tener una buena biocompatibilidad, su degradación

es muy lenta o nula lo cual puede generar problemas de liberación y por ende problemas de absorción de fármacos. Por lo que dentro de la comunidad científica se han sintetizado distintos hidrogeles con diferentes polímeros para mitigar o eliminar algunas de estas desventajas.

I.6.4.1. Aplicaciones de los hidrogeles

En la actualidad se han reportado diversas aplicaciones clínicas de los hidrogeles, de los cuales destacan:

I.6.4.1.1. Problemas oculares

Las enfermedades oculares presentan una alta incidencia a nivel mundial, afectando directamente la visión y la calidad de vida de las personas que las padecen. Existen diversos tratamientos para tratar las diferentes enfermedades que puedan llegar a presentarse, sin embargo los ojos son un órgano bastante complejo, ya que este presenta barreras anatómicas y fisiológicas (**Figura 5**) que limitan la eficacia de los tratamientos existentes. Debido a esto se ha buscado diseñar nuevas formas de administración de fármacos oftálmicos que favorezcan y mejoren la eficacia del tratamiento ²⁷.

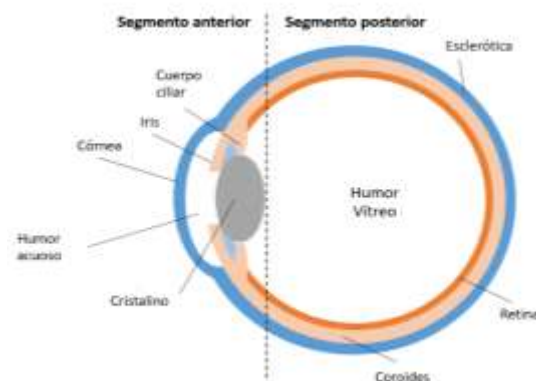


Figura 5. Esquema de la anatomía del ojo (Torres-Luna C, 2020).

Dentro de la investigación para el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos oftálmicos están los hidrogeles, ya que estos ofrecen varias ventajas en comparación con los métodos de dosificación existentes. Estudios han demostrado que los hidrogeles aumentan el tiempo de residencia de los ingredientes activos y resisten el aclaramiento de las formulaciones oftálmicas provocadas por el parpadeo ²⁷.

En la actualidad existen productos comerciales que utilizan hidrogeles para aplicaciones oftálmicas, un ejemplo de ellos son lentes de contacto blandas correctivas, lentes intraoculares plegables, o vehículos gelificantes in situ para la administración de fármacos oftálmicos ²⁷.

I.6.4.1.2. Infecciones vaginales

Las infecciones vaginales se han considerado un problema de salud pública debido a su alta prevalencia en mujeres adultas (**Figura 6**), estas representan el 70% de las quejas y la demanda de consulta médica. Las manifestaciones clínicas se asocian a inflamación, que conllevan a la aparición de diversas molestias, entre ellas se encuentra el prurito, secreciones, dolor al orinar y/o durante la actividad sexual, afectando así la calidad de vida de las mujeres ²⁸.

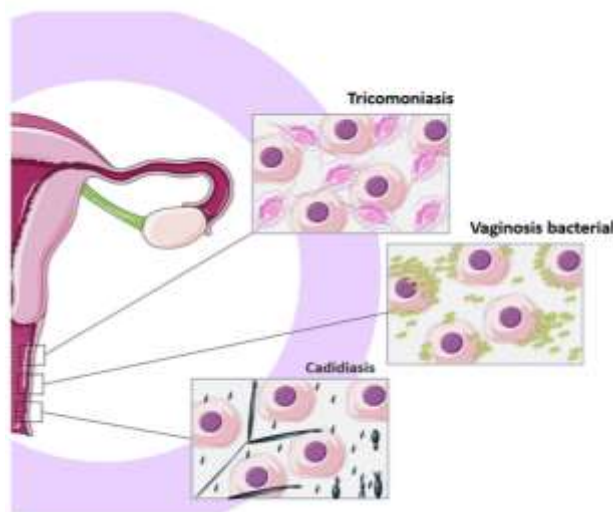


Figura 6. Infecciones vaginales más comunes (Martins dos Santos A, 2020).

La vagina ha sido ampliamente estudiada en los últimos años como una vía alterna de administración de fármacos, debido a grandes ventajas que esta puede llegar a presentar, como su gran superficie de contacto, buena permeabilidad y su alta vascularización, además de superar problemas de metabolismo como el efecto de primer paso y degradación gastrointestinal. Debido a estas ventajas se propone como una vía de administración idónea para tratamientos de diferentes patologías como infecciones vaginales, vaginitis atrófica, lesiones neoplásicas así como para el uso de anticonceptivos ²⁸.

Los hidrogeles tienen potencial de aplicación vaginal, ya que estos favorecen la permanencia de la formulación sobre la mucosa vaginal, permitiendo reducir las dosis y por tanto, una mayor eficacia terapéutica, en relación a las formas farmacéuticas convencionales. Además los hidrogeles ofrecen un sistema controlado de fármacos, derivado de las propiedades poliméricas del material utilizado. Entre varios materiales poliméricos, los polímeros con propiedades mucoadhesivas y de respuesta térmica han generado gran atención para la administración de fármacos por vía vaginal ²⁸.

I.6.4.1.3. Aplicaciones tópicas

La administración local de fármacos ha sido un campo central dentro del área de la biomedicina, cuyo desarrollo promete grandes avances para la salud humana. Este tipo de administración comprende una gran variedad de sistemas y formulaciones, las cuales tienen como objetivo el transportar fármacos al sitio de acción deseado, brindando un efecto terapéutico mayor, aumentando su biodisponibilidad y disminuyendo sus efectos secundarios ²⁹.

Dentro de este campo los hidrogeles han tomado una gran importancia, debido a su similitud con los tejidos humanos, que cargados con algún fármaco de interés, estos pueden facilitar su administración. Una de las aplicaciones que se le ha dado a los hidrogeles es que funjan como apósitos para heridas (**Figura 7**), se ha demostrado que los apósitos de hidrogel son excelentes materiales, ya que

hidratan naturalmente la piel y mantienen la zona de la herida húmeda, lo que genera una aceleración en el proceso de cicatrización, calma y enfría las quemaduras y reduce el dolor y la inflamación. Los hidrogeles pueden ser cargados con antibióticos y agentes antiinflamatorios, colocándolos directamente en la herida, reduciendo el riesgo de infección ^{30,31}.



Figura 7. Apósito a base de hidrogel para el tratamiento de quemaduras (IES Medical, 2018).

Las características que deben cumplir los hidrogeles para ser destinados a aplicaciones tópicas incluyen: una alta biocompatibilidad, gran capacidad de carga, una buena adherencia a la piel y una estabilidad mecánica suficiente para facilitar su eliminación. Además no deben de interferir con el crecimiento celular y la formación de nuevos tejidos ³⁰.

I.6.4.1.4. Terapia contra el cáncer

El cáncer es la enfermedad más prevalente y con la tasa de mortalidad más alta a nivel mundial, a través de los años se ha buscado diseñar diversos tratamientos los cuales ayuden a combatir y aumentar los casos de recuperación total. Los tratamientos actuales ayudan a reducir el índice de mortalidad, sin embargo la mayoría de los tratamiento suelen ser bastantes costosos, además de generar diversos efectos adversos, un ejemplo de ellos son las quimioterapias ³².

En los últimos años se ha reportado un aumento en el cáncer de piel, el cual se puede definir como un tumor maligno derivado de los melanocitos y las células névicas. Este cáncer se puede presentar en piel, mucosa, en toda región anatómica que presente melanocitos tales como cavidad bucal, ojo, ano o genitales ³³.

A raíz de estas complicaciones con los tratamientos existentes, se ha buscado diseñar tratamientos con un costo accesible y que no genere efectos adversos, además de que este sea más cómodo para el paciente y tenga una mejor calidad de vida. Dentro de estas investigaciones se ha propuesto el uso de hidrogeles como sistema inteligente de liberación de fármacos anticancerígenos, debido a su capacidad de generar una liberación específica de fármaco y así disminuir dosis, durabilidad y aumentar la eficacia de los tratamientos ^{30,32}.

I.6.5. Propranolol

El propranolol (**Figura 8**) es un medicamento antihipertensivo, actúa como antagonista competitivo en los receptores beta adrenérgicos (β_1 y β_2). Además de su uso contra la hipertensión, este es utilizado para tratar diversas enfermedades como feocromocitoma subaórtica hipertrófica (enfermedad del corazón), anginas, dolores de cabeza por migraña y mejorar la supervivencia después de sufrir un infarto. Funciona relajando los vasos sanguíneos y reduciendo el ritmo cardíaco mejorando el flujo de sangre a través del cuerpo y disminuyendo la presión arterial ³⁴.

Estudios han indicado que el uso de propranolol en el tratamiento de hemangiomas puede ser una alternativa eficaz y segura, ya que este genera una vasoconstricción, induce la apoptosis de células endoteliales modificando la expresión de los genes del factor de crecimiento vascular endotelial y del factor de crecimiento fibroblástico básico. Los pacientes tratados con este medicamento han tenido un impacto positivo, presentando mejoras notorias ³⁵.

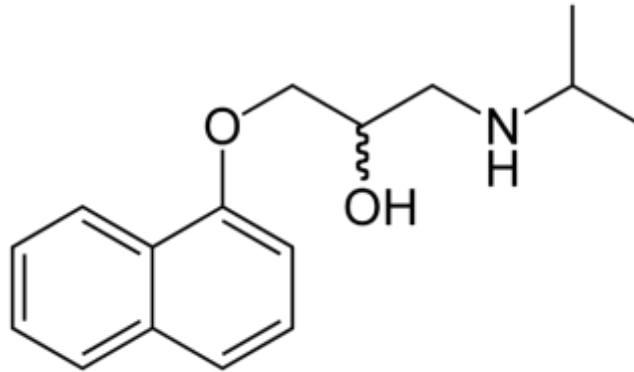


Figura 8. Estructura de propranolol (Stabilis, 2022).

I.6.6. Ácido salicílico

El ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) recibe su nombre de *Salix*, que es la denominación latina del sauce, del cual fue aislado de su corteza por primera vez (**Figura 9**). Es un sólido incoloro que suele presentarse en cristales en forma de agua. Es un ácido orgánico débil, que presenta características antiinflamatorias, pero debido a que su uso directo provoca irritaciones estomacales no se aplica como tal, sino en forma de sus derivados, siendo los más conocidos el ácido acetilsalicílico (Aspirina) y el salicilato de metilo ³⁶.

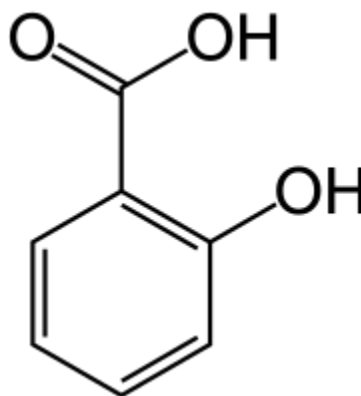


Figura 9. Estructura de ácido salicílico (Benjah, 2007).

El ácido salicílico presenta diversas propiedades farmacológicas y medicinales, una de las más conocidas es su efecto antipirético (alivio contra la fiebre), sin

embargo, a través de los años se han descubierto otras propiedades terapéuticas tales como antiséptico bucal, ya que restituye el ácido protector de las mucosas ejerciendo un efecto antiséptico ^{36,37}.

Otra característica del que presenta el ácido salicílico es su efecto queratolítico, el cual es utilizado para eliminar y prevenir la aparición de espinillas y otras manchas de la piel en personas con acné. El ácido salicílico también es utilizado para tratar enfermedades de la piel que se caracterizan por descamación o crecimiento excesivo de las células cutáneas, como psoriasis, ictiosis, caspa, callos y verrugas en manos y pies ^{36,37}.

Dentro de las aplicaciones tópicas del ácido salicílico, se ha reportado que gracias a su efecto queratolítico se puede utilizar para enfermedades específicas de la piel, tales como los hemangiomas de tipo verrugoso, los cuales se han tratado con una pomada de ácido salicílico al 3%, en conjunto con una pomada de halobetasol al 0.05%. Los resultados obtenidos de esta investigación fueron prometedores, ya que el ácido salicílico facilita la descamación de la parte superior del hemangioma (parte verrugosa), ayudando a mejorar el efecto del halobetasol lo cual a su vez disminuye el área afectada, el sangrado durante la cirugía y obtener mejores resultados cosméticos ³⁸.

I.6.7. Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo es un tipo de espectroscopia vibracional que mide la absorción de radiación infrarroja presente en una muestra y proporciona información sobre los grupos funcionales que la componen. Se fundamenta en la interacción de la materia con la radiación, dicha interacción provoca procesos como la absorción o la difusión. Cuando una molécula emite un fotón, su estado energético cambia, manifestándose como un cambio en la energía traslacional de la molécula, y como un cambio en su estado electrónico vibracional o rotacional.

La frecuencia de la vibración depende de la masa de los átomos. Entre más pesado sea un átomo su vibración será más lenta. También dependerá del tipo de enlace que presente la molécula, los dobles enlaces son más fuertes que los enlaces sencillos, por lo cual los dobles enlaces vibran a una frecuencia más alta, existen otro tipo de enlace más fuertes, como es el caso de los enlaces O-H y N-H, por lo que al igual que los dobles vibran a una frecuencia más alta. La frecuencia e intensidad de los distintos modos de vibración es sensible a la estructura química y física de cada molécula. Para cada molécula dada, su espectro de absorción/emisión constituye una “huella” de la misma, por lo tanto, la espectroscopia de infrarrojo se aplica para la identificación de polímeros. Un espectro de infrarrojo (**Figura 10**) tiene como ordenada la transmitancia y como abscisa el número de onda (cm^{-1})³⁹.

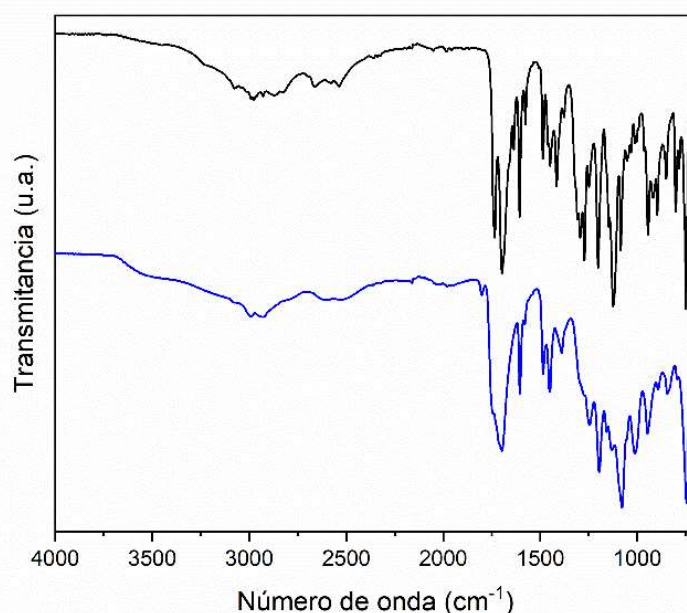


Figura 10. Ejemplo representativo de espectroscopia de infrarrojo (Diseño propio).

I.6.8. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (**Figura 11**) se desarrolló a finales de los años cuarenta con el fin de estudiar los núcleos atómicos, fue hasta

1951 donde se descubrió que la espectroscopia de RMN podía utilizarse para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos, esta técnica solo puede utilizarse para núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones. Los átomos de hidrogeno, carbono, flúor y fosforo son los únicos que son magnéticamente activos, es decir poseen espín y un movimiento de electrones, ya que sus núcleos presentan carga positiva y poseen movimiento de rotación sobre un eje que provoca un comportamiento tipo imán.

Cuando una muestra se encuentra en ausencia de un campo magnético, los espines se orientan al azar, pero cuando esta es sometida a un campo magnético sus núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, a este estado se le denomina espín α , a su vez existen núcleos con carga negativa, estos se orientan en dirección opuesta al campo magnético, este estado se denomina espín β . Una vez que los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia dependerá de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta la señal emitida y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, llamado espectro de RMN ⁴⁰.

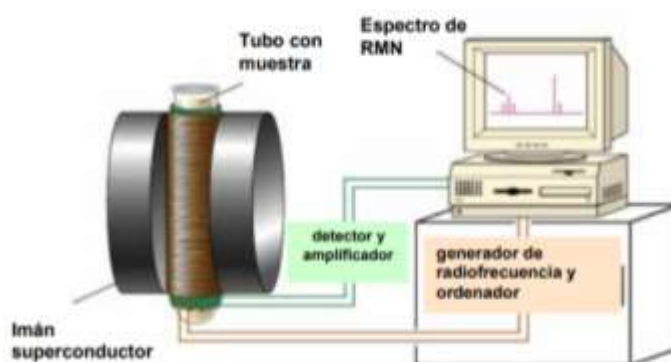


Figura 11. Esquema de los principales componentes de un espectrómetro de RMN (Fundamentos de química orgánica, 2007).

I.6.9. Termogravimetría (TGA)

La termogravimetría (**Figura 12**) forma parte de un conjunto de análisis térmicos que se han desarrollado para identificar y medir los cambios físicos y químicos que puedan presentar los materiales cuando son expuestos a variaciones controladas de temperatura. Este análisis se utiliza para el estudio de las reacciones primarias en la descomposición de materiales sólidos y líquidos, además se analizan procesos de desorción, adsorción y reacciones de descomposición en un ambiente de gas inerte o en presencia de oxígeno.

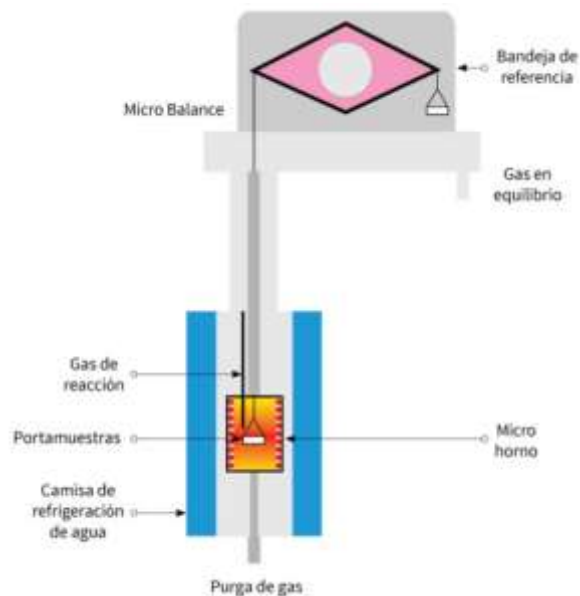


Figura 12. Fundamento del análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico consiste en registrar la variación de la masa del material expuesto conforme varía la temperatura a una tasa térmica constante (cambio de temperatura lineal). Como resultado se obtienen datos de cambio de masa con respecto a la temperatura o al tiempo y un termograma (**Figura 13**) que representa gráficamente las variaciones de masa. Esta técnica es utilizada para la caracterización cuantitativa y caracterización cinética de polímeros, carbón y arcillas, entre otros materiales ⁴¹.

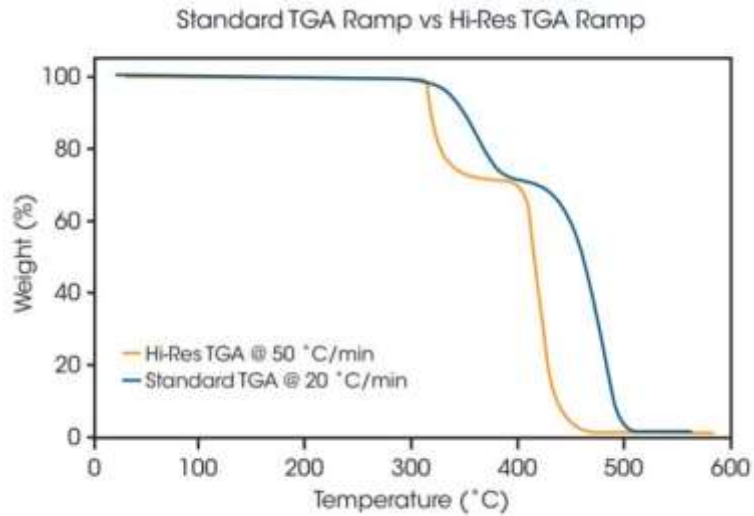


Figura 13. Ejemplo de gráfico obtenido después de un estudio de termogravimetría (Waters, 2022).

I.6.10. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) es una técnica de obtención de imágenes (**Figura 14**) utilizada en la investigación de materiales, debido a su alta resolución y capacidades de analizar características morfológicas, estructurales y químicas de las muestras en estudio ⁴².



Figura 14. Fibras de Lycra vistas por SEM (Museum of Applied Arts & Sciences, 2019).

El microscopio está equipado con diferentes detectores, de los cuales destacan el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Imagen), un detector de electrones retrodispersados con el

cual se obtienen imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Imagen) y un detector de energía dispersa EDS (Energy Dispersive Spectrometer), este permite colectar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativos y de distribución de elementos en la superficie (**Figura 15**). Una de las principales utilidades que presenta esta microscopía son la alta resolución de imágenes, la gran profundidad de campo que da una apariencia tridimensional y la sencilla preparación de las muestras ⁴³.



Figura 15. Esquema de un microscopio electrónico de barrido (EcuRed, 2013).

I.6.11. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución o HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography) es una técnica de separación de compuestos. Esta técnica como las diferentes técnicas cromatográficas existentes, se fundamenta en la separación de compuestos en una muestra mediante la utilización de una fase estacionaria y una fase móvil, específicamente es una cromatografía en columna, en esta la que la fase móvil circula a través de la columna (fase estacionaria) a una presión determinada. Se compone de al menos 5 módulos (**Figura 16**), esto dependerá de las funciones que se requieran realizar, cuenta con un sistema de bombeo (una o varias bombas, con o sin formación de

gradientes), inyector de muestras (manual o automático), módulo para columna, un módulo de detección (uno o más detectores) y un sistema de procesamientos de datos, el cual emitirá una representación gráfica denominada cromatograma (Plou F, Torres P, n.d.)

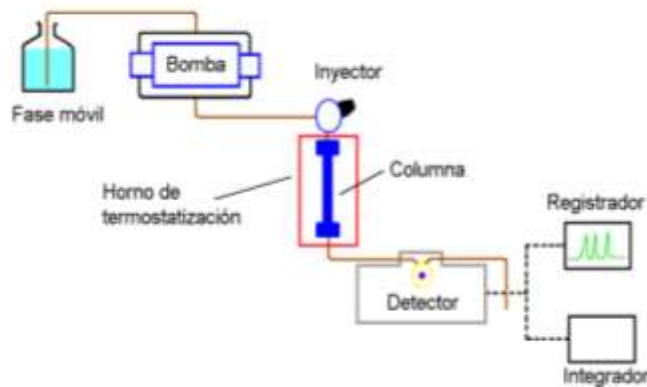


Figura 16. Fundamento de la cromatografía de líquidos de alta resolución (García A, 2016).

Actualmente la cromatografía de líquidos de alta resolución es la más utilizada a nivel industrial e investigativo, ya que esta brinda una serie de ventajas que otras cromatografías no presentan de las cuales destacan que es una técnica rápida, requiere un volumen pequeño de muestra, automatización en la introducción de muestra, las columnas pueden reutilizarse y permite la separación, identificación y cuantificación de analitos (**Figura 17**). Debido a todas estas ventajas existen diversas aplicaciones, algunas de las más significativas son el análisis de aminoácidos, proteínas, fármacos, drogas entre otras ⁴⁴.

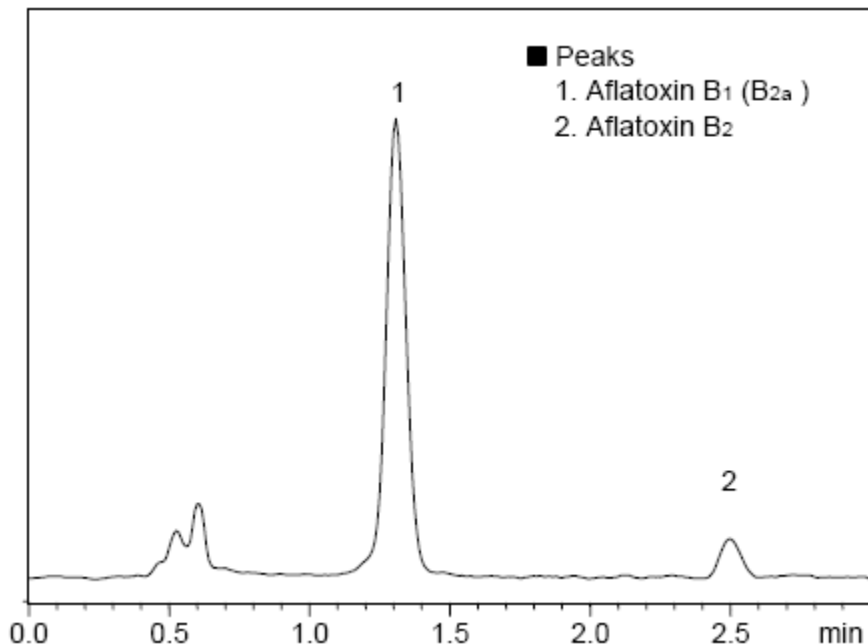


Figura 17. Ejemplo de un cromatograma obtenido a través de HPLC (Notijenck, 2008).

CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL

II.1. Síntesis y caracterización de monómero.

II.1.1. Síntesis de monómero de ácido 2-metacrililoxibenzoico (MAOB).

La síntesis del monómero se realizó a través de una reacción de esterificación, donde se lleva a cabo un ataque nucleofílico por parte del oxígeno del grupo hidroxilo del ácido salicílico, al carbonilo presente en el anhídrido metacrílico, dando como resultado una sustitución nucleofílica acílica exitosa, mediada por el catalizador 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Figura 18).

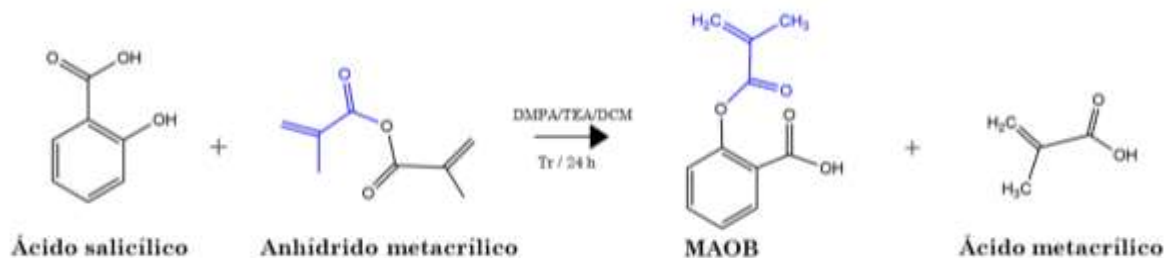


Figura 18. Síntesis de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico.

La síntesis del monómero (ácido 2-metacrililoiloxibenzoico) se llevó a cabo mediante la metodología descrita en la literatura (Licea-Claverie et al., 2003), la cual se describe a continuación:

En un matraz bola de 100 mL se colocaron 6.91 g de ácido salicílico, 0.49 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) con 20 mL de diclorometano y 8.42 mL de trietilamina. Se colocó en agitación constante dentro de un baño de hielo (0°C), hasta que todos los reactivos se encontraran completamente disueltos. Una vez disueltos se agregaron 7.50 g de anhídrido metacrílico gota a gota con ayuda de una bomba de adición durante 3 horas, transcurrido el tiempo se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas.

La solución obtenida se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL, se colocó en un baño de hielo (0°C) y se acidificó con ácido clorhídrico 3 N hasta alcanzar un pH de 3. Se procedió a extraer el precipitado con éter etílico en un embudo de separación, la fase orgánica obtenida se trató con 20 mL de una solución de ácido clorhídrico y 20 mL de agua destilada. La fase se lavó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró a vacío y se dejó cristalizar a temperatura ambiente durante 24 horas.

El sólido obtenido se lavó en tres ocasiones con 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente y 30 mL de agua destilada a 40°C, una vez terminado el lavado se disolvió en hexano a 65°C, una vez disuelto se filtró a vacío y se dejó recrystalizar durante 24 horas, esto con el fin de obtener un monómero puro, terminadas las 24 horas se secó a 40°C en una estufa de vacío hasta que el monómero se encontraba completamente seco. Terminado el proceso de secado

se procedió a resguardar en un vial de vidrio y se conservó a temperatura ambiente.

II.1.2. Caracterización del monómero

Al monómero sintetizado se le realizaron tres pruebas para una correcta caracterización, se realizó una cromatografía en capa fina, esta con el fin de evaluar y verificar la pureza del monómero, en la cual se comparó el monómero obtenido contra un estándar de ácido salicílico. También se realizó un estudio de espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada en un intervalo de $450 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, y una resonancia magnética nuclear de protón, todas las pruebas fueron realizadas en la Universidad Autónoma de Baja de California. Las metodologías implementadas se explican a continuación:

II.1.2.1. Cromatografía de capa fina

Se preparó una fase móvil la cual consistía en éter de acetato de etilo / hexano en una proporción 32:68. Se cortó una tira de placa cromatográfica con unas dimensiones de 2 cm x 4.5 cm, una vez obtenida la placa se cargó con una solución estándar de ácido salicílico y el monómero sintetizado. Posteriormente se colocó la placa en una cámara cromatográfica con la fase móvil y se dejó durante unos minutos. Una vez terminado el proceso se reveló con luz negra (UV) y se realizaron los cálculos correspondientes.

II.1.2.2. Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Se tomó una cantidad suficiente de monómero ácido 2-metacrilóiloxobenzoico y se leyó en el espectrofotómetro de infrarrojo con ATR marca thermo scientific modelo thermo Nicolet IS5.

II.1.2.3. Resonancia Magnética nuclear de protón

Se colocaron 25 mg del monómero sintetizado en un tubo de resonancia con 0.6 mL de cloroformo deuterado, se agito hasta que el monómero estuviera completamente disuelto. Una vez disuelto se procedió a colocar dentro del equipo y se realizó el estudio correspondiente.

II.2. Preparación de hidrogeles de ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (MAOB) - Propranolol al 2.5%.

La preparación de hidrogeles se realizó a partir del monómero sintetizado (MAOB), mediante una reacción de polimerización en disolución vía radicales libres. Los hidrogeles se elaboraron en forma de lámina delgada (espacio equidistante entre dos placas de vidrio).

Para llevar a cabo la reacción de síntesis de hidrogeles se utilizó dimetacrilato de etilenglicol purificado (EGDMA) como agente entrecruzante, azobisisobutinitrilo (AIBN) como iniciador de la reacción y dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente. La metodología utilizada se describe a continuación:

II.2.1. Preparación de hidrogeles entre placas de vidrio.

En un matraz bola de 100 mL se agregó 3.5 g de monómero (MAOB), 0.1 g de Propranolol, 0.02 g de AIBN, 0.06 mL de EGDMA y 5 mL de DMSO, y se colocó en agitación constante hasta una completa disolución de los reactivos.

La solución obtenida se colocó con agitación constante y se desgasificó durante 10 minutos con ayuda de nitrógeno. Por otro lado, se colocó un espaciador de plástico de 2 mm de diámetro, entre dos placas de vidrio de 10 cm x 10 cm ensambladas y ajustadas con pinzas de metal. Terminados los 10 minutos de desgasificación, con ayuda de una micropipeta de 1000 µL se colocó la solución obtenida dentro del molde de vidrio previamente preparado, se posicionó verticalmente en una estufa bajo condiciones de atmósfera inerte de nitrógeno a 60°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se extrajo el molde de la estufa y se dejó atemperar durante 5 minutos, posteriormente se extrajo el

hidrogel formado cuidando de no generar fracturas durante el proceso. El hidrogel obtenido se colocó dentro de un recristalizador de vidrio y se realizó un lavado con suficiente metanol hasta cubrir completamente el hidrogel durante 5 minutos. Finalmente se procedió a cortar el hidrogel en pequeños parches (rectángulos) de 2 cm x 1.5 cm de tamaño con ayuda de un cortador de metal, los hidrogeles obtenidos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas y fueron resguardados dentro de una bolsa de plástico.

Para realizar la prueba de viabilidad celular, se prepararon hidrogeles a diferentes concentraciones, al 1 y 5%, estas preparaciones se llevaron a cabo con la misma metodología descrita previamente, ajustando las cantidades de monómero y propranolol.

II.2.2. Caracterización por Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Los hidrogeles sintetizados se caracterizaron por FTIR-ATR, a la par se analizaron estándares de MAOB y propranolol. Se tomó una cantidad suficiente de monómero, propranolol e hidrogel y se leyó en el espectrofotómetro de infrarrojo con ATR marca thermo scientific modelo thermo Nicolet IS5.

II.3. Estudio de hinchamiento

Para conocer los cambios en el grado de hinchamiento que presentan los hidrogeles fabricados con el monómero de MAOB con respecto al pH, se llevaron a cabo experimentos de hinchamiento en soluciones amortiguadoras pH= 5.5 y 7.4, preparadas a base de fosfatos.

Para llevar a cabo esta prueba, se obtuvo previamente el peso de cada uno de los hidrogeles secos. Posteriormente se colocó un parche del hidrogel en un vaso de precipitado de 50 mL con 25 mL de medio, los medios utilizados en esta prueba fueron, Buffer pH 5.5 y 7.4, se realizó por triplicado a temperatura ambiente (25°C)

y a 37°C (temperatura promedio en piel). Los tiempos de pesado fueron de 5, 15, 30, 45, 60, 120 minutos, una vez transcurridas las 2 horas se pesó cada dos horas hasta cumplir 8 horas, posteriormente se pesó cada 24 horas hasta cumplir 72 horas. Una vez terminado el estudio se procedió a retirar el hidrogel del medio y se secó el excedente con cuidado de no generar algún daño.

II.4. Estudio de hidrólisis – liberación

Previo a los estudios de hidrólisis - liberación, se estableció una curva de calibración para el ácido salicílico y propranolol. Ésta se obtuvo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cuyas lecturas se efectuaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que el estudio de liberación.

La metodología que se siguió para el estudio de hidrólisis - liberación fue la siguiente: en un contenedor de vidrio se colocaron 10 mL de medio (pH= 5.5 y 7.4) previamente atemperado a 37°C, se añadió un parche de hidrogel y se colocó dentro de un oscilador a una temperatura constante de 37°C a 100 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 mL del medio durante los siguientes intervalos: 30, 60, 120, 240, 360, 480, 1440, 2880, 4320 minutos. Las alícuotas tomadas se analizaron por CLAR. Estos estudios se realizaron por triplicado.

II.4.1. Cuantificación de fármacos por Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Para la cuantificación de muestras del estudio hidrólisis- liberación se desarrolló el siguiente método cromatográfico:

II.4.1.1. Preparación de fase móvil (Solución A)

En un vaso de precipitado de 1000 mL se colocaron 13.3 g de fosfato monobásico de sodio y 1000 mL de agua destilada con agitación constante, una vez disuelto se le agregaron 5 mL de trietilamina y se dejó agitar por 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se ajustó a un pH de 3.0 con ácido fosfórico. Finalmente se filtró y desgasificó durante 10 minutos y se colocó en un reservorio con capacidad de 1000 mL.

II.4.1.2. Preparación de fase móvil (Solución B)

Se filtró y desgasificó durante 10 minutos 1000 mL de Acetonitrilo grado HPLC. Se colocó en un reservorio con capacidad de 1000 mL.

II.4.1.3. Condiciones cromatográficas

- **Fase móvil:** Solución A: Solución B (70:30)
- **Columna:** Supelco NUCLEOSIL 100-5C18, 150 x 4.6 mm, 5µm
- **Temperatura de columna:** 45°C
- **Flujo:** 1.200 mL/min
- **Longitudes de onda:** 235, 270, 280, 291 nm
- **Tiempo de corrida:** 6 minutos

II.5. Estudio de viabilidad celular.

Para llevar a cabo esta prueba se evaluaron 3 tipos de hidrogeles de MAOB – Propranolol al 1, 2.5 y 5%, con la finalidad de observar si la concentración de Propranolol afectaba el crecimiento celular.

II.5.1. Crecimiento de líneas celulares

En esta prueba se utilizaron 3 diferentes líneas celulares, HeLa, Fibroblastos 3T3 y Melanoma. Para las cuales se utilizó la siguiente metodología:

1. Se retiró un vial con células del tanque de nitrógeno y se dejó atemperar durante unos minutos.
2. Posteriormente se colocaron las células dentro de un contenedor T25 con capacidad de 30 mL con 3 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).
3. Finalmente se colocaron dentro de una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y se dejaron durante 24 horas para verificar si las células se adhirieron al contenedor.
4. Comprobada la adherencia de las células se estuvo cambiando el medio al contenedor hasta obtener un número adecuado de células para llevar a cabo las pruebas posteriores.

II.5.2. Estudio de citotoxicidad (conteo de células)

La metodología que se describe a continuación fue utilizada en las 3 líneas celulares utilizadas:

1. Se retiró de la incubadora el contenedor T25 con células suficientes y se retiró el medio de DMEM. Se agregaron 3 mL de PBS para realizar un lavado por un minuto y se retiró con ayuda de una bomba de vacío.
2. Se agregó 1 mL de tripsina durante 3 minutos (se estuvo observando al microscopio para evitar muerte celular).
3. Una vez transcurrido el tiempo con tripsina se adicionaron 3 mL de medio DMEM, para neutralizar el efecto de la tripsina.
4. Posteriormente se tomó todo el líquido y se colocó dentro de un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Una vez terminado el tiempo se retiró el medio y se dejó el precipitado formado.
5. Al precipitado formado se le agregó 2 mL de medio y se homogenizó. Una vez homogenizado se tomó 10 μ L del medio y se colocaron en una caja de 96 pocillos con 10 μ L de azul de tripan y se mezcló.
6. Se tomaron 10 μ L del mezclado y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar un conteo de células.

II.5.3. Estudio de citotoxicidad (Actividad metabólica MTT)

1. En una caja de 96 pocillos se colocaron 100 μ L de solución madre de células y 100 μ L de medio DMEM en 12 pocillos. A la par en pocillos diferentes se colocaron 200 μ L de medio y se colocó un pedazo de hidrogel a diferentes concentraciones (1, 2.5 y 5%), y se colocó dentro de una incubadora a 37°C, 5% de CO₂, durante 24 horas.
2. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el medio de liberación de los hidrogeles y se resguardó en tubos eppendorf's. Posteriormente se retiró el medio de todos los pocillos.

3. Se preparó por triplicado un control de células, a los cuales se les agregó 200 μL de medio DMEM. De igual manera por triplicado se colocó 100 μL de medio de liberación de los 3 tipos de hidrogeles en pocillos con células y 100 μL de medio DMEM, se dejó incubar durante 24 horas a 37°C, 5% de CO_2 .
4. Pasadas las 24 horas se retiró el medio de todos los pocillos, y se le agregaron 110 μL de una solución 1:10 de reactivo de MTT, y se dejó reposar durante 4 horas en una incubadora a 37°C, 5% de CO_2 .
5. Transcurrido el tiempo, se agregaron 100 μL de reactivo revelador de MTT y se deja reposar durante 12 horas.
6. Finalmente se leen las absorbancias de los pocillos a 3 diferentes longitudes de ondas (405, 450 y 620 nm).

II.6. Estudio de evaluación de actividad antimicrobiana.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon dos diferentes medios de cultivo, su preparación se describe a continuación:

II.6.1. Preparación de medio Müller-Hinton.

1. En un matraz Erlenmeyer de 1000 mL con 750 mL de agua purificada, se colocaron 28.5 g de agar Müller-Hinton hasta disolver.
2. Una vez disuelto, se coloca a fuego directo con ayuda de un mechero meker, un soporte de hierro y una tela de asbesto, has que ebulle.
3. La solución obtenida se coloca dentro de un reservorio de vidrio con capacidad de 1000 mL, y se coloca en autoclave durante 1 hora.
4. Transcurrido el tiempo, se deja atemperar y se coloca dentro de cajas petri. Se deja gelificar durante unos minutos y finalmente se colocan dentro de un refrigerador entre 2 – 8°C par su resguardo.

II.6.2. Preparación de agar Infusión Cerebro – Corazón (BHI)

1. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 3.7 g de BHI con 100 mL de agua purificada.

2. Posteriormente se coloca a fuego directo hasta una completa disolución y ebullición.
3. Una vez disuelto se procede a colocar 5 mL de la solución obtenida en tubos de ensayo con rosca. Posteriormente se colocan en autoclave durante 1 hora.
4. Transcurrido el tiempo se dejan atemperar y se reguardan dentro de un refrigerados entre 2 – 8°C.

II.6.3. Estudio de actividad antimicrobiana.

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron dos bacterias diferentes, una bacteria gram negativo (*E.coli*) y una gram positiva (*S.aureus*). A cotinuación se describe la metodología utilizada para realizar la prueba:

Lo primero que se realizó fue la obtención de un cultivo de 24 horas de cada bacteria, por lo cual en una caja petri con agar Müller-Hinton se siembra cada bacteria a evaluar, a través de la técnica de estriado multiple, una vez terminado el sembrado se procede a colocar dentro de una incubadora a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas se procedio a preparar diferentes estandares de cada bacteria en tubos con agar BHI a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland. Las muestras preparadas en los tubos fueron: un blanco de medio BHI, un control positivo de bacterias, un control negativo de medio BHI con hidrogel de MAOB – Propranolol, y un duplicado de medio BHI inoculado con bacterias e hidrogel de MAOB – Propranolol.

Una vez obtenidos los tubos, se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 600 nm al inicio del estudio, una vez obtenidas las absorbancias, se colocaron dentro de una incubadora a 37°C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se leyeron las absorbancias de todas las muestras, posteriormente se tomó 1 mL de muestra y se sembró en una caja Petri con agar Müller-Hinton con la técnica de extensión con varilla codada, una vez terminado el sembrado se colocaron dentro de una incubadora a 37°C

durante 24 horas. Finalmente se mide la inhibición de las muestras en caso de presentar.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

III.1. Síntesis y caracterización de monómero

III.1.1. Síntesis de monómero de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico

Se obtuvo un monómero en forma de polvo color blanco, dado a través de una reacción de esterificación, donde se lleva a cabo un ataque nucleofílico por parte del oxígeno del grupo hidroxilo del ácido salicílico, al carbonilo presente en el anhídrido metacrílico, dando como resultado una exitosa sustitución nucleofílica acílica, mediada por el catalizador utilizado en la reacción (DMAP). El rendimiento de reacción obtenido fue de 86.95%.

III.2. Caracterización de monómero de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico

III.2.1. Cromatografía de capa fina.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para que el solvente separara los compuestos se dejó secar la placa por unos minutos, posteriormente con ayuda de una luz negra (UV), se reveló la placa. Como podemos observar en la imagen, existe la presencia de dos puntos, en el punto **A** se encuentra una muestra estándar de ácido salicílico, en el punto identificado con la letra **B** se encuentra el monómero de MAOB sintetizado (**Figura 19**).



Figura 19. Resultado de cromatografía en capa fina.

Se procedió a calcular el factor de retención de cada muestra a través de la siguiente fórmula:

$$Rf = \text{Distancia recorrida de la muestra} / \text{Distancia recorrida del solvente}$$

$$Rf_A = 2.5 \text{ cm} / 3.9 \text{ cm} = \mathbf{0.64}$$

$$Rf_B = 2.0 \text{ cm} / 3.9 \text{ cm} = \mathbf{0.51}$$

En relación a su factor de retención, se puede notar que existe una diferencia mínima entre la muestra estándar de ácido salicílico (**0.64**) y el monómero de MAOB (**0.51**), esta diferencia se atribuye a su composición estructural, ya que la estructura del monómero de MAOB es más grande a la estructura del ácido salicílico, por ende, el desplazamiento del monómero será más lento.

III.2.2. Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

A continuación, se muestra una tabla con los grupos funcionales característicos en el monómero de MAOB:

Tabla I. Grupos funcionales característicos en el monómero de MAOB.

Grupo Funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
Aromático (=C-H)	3150 – 3050
Alquenos (C-H)	3000 – 2850
Ácido Carboxílico (O-H)	3400 – 2400
Bandas de combinación (O-SUST)	2000 - 1800
Éster (C=O)	1750 - 1730
Ácido Carboxílico (C=O)	1725 – 1700
Vinílico (C=C)	1600 – 1475
Éster (C-O)	1300 - 1000
Aromático (C-H)	900 - 690

El espectro de infrarrojo del monómero de MAOB sintetizado (**Figura 20**), presenta bandas características, a 3234.80 cm⁻¹ se observa una señal con intensidad baja asociada al estiramiento =C-H del anillo aromático presente en la estructura, a 2974.12 cm⁻¹ se presenta una señal de intensidad baja asociada al estiramiento C-H (alifático), a 2664.14 cm⁻¹ se observa una señal con intensidad baja asociada al estiramiento O-H del ácido carboxílico, a 1733.94 cm⁻¹ se observa una banda de intensidad fuerte asociada al estiramiento del enlace C=O (correspondiente al Éster), a 1697.84 cm⁻¹ se presenta una banda de intensidad fuerte asociada al

estiramiento C=O (correspondiente al ácido carboxílico), a 1636.87 cm^{-1} se observa una banda de intensidad baja asignada al estiramiento C=C (correspondiente al enlace vinílico), entre los 1300 y 1000 cm^{-1} se presentan bandas de intensidad media a fuerte asociadas a las vibraciones C-O (correspondientes al Éster), finalmente a 749.04 cm^{-1} se observa una banda de intensidad fuerte asociada al estiramiento C-H presente en los anillos sustituidos.

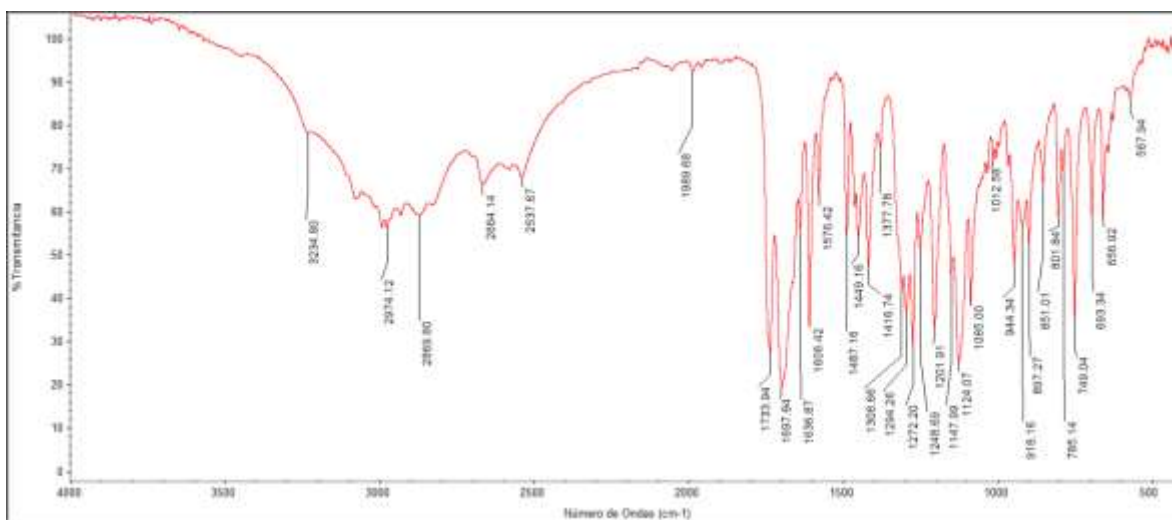


Figura 20. Espectro de infrarrojo de monómero de MAOB.

III.2.3. Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- H^1)

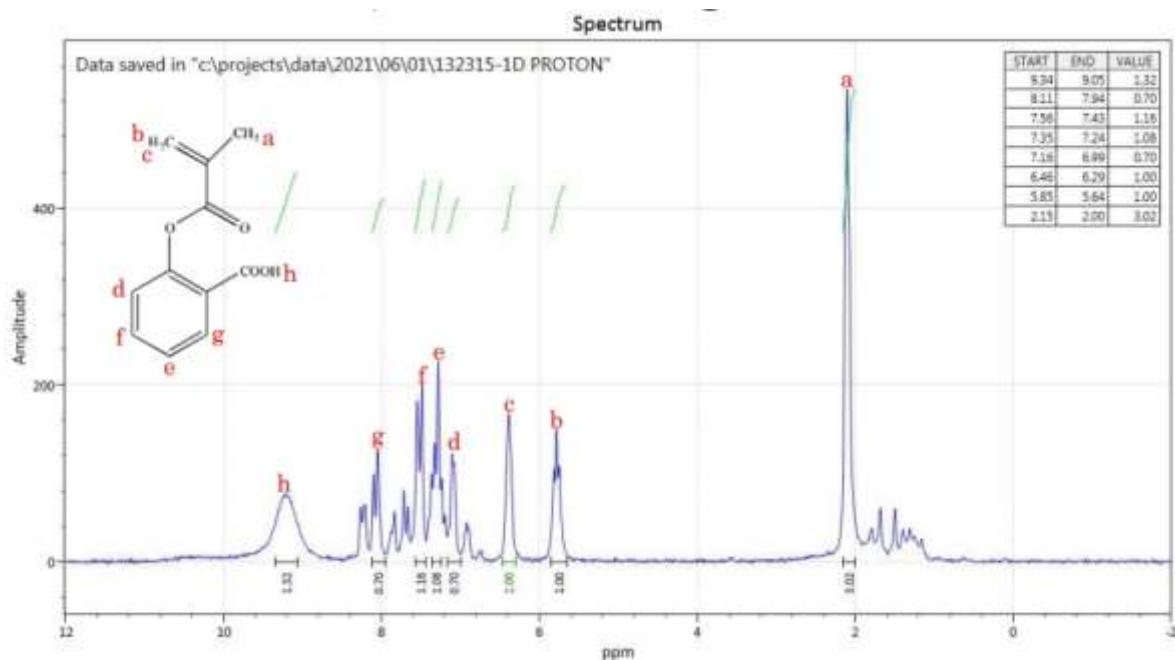


Figura 21. Espectro de RMN- H^1 del monómero de MAOB.

El espectro obtenido en la resonancia magnética nuclear de protón (**Figura 21**), se pueden identificar los protones hidrogeno presentes en la estructura de la molécula del monómero de MAOB, a 2.15 ppm se observa un singulete que integra para los tres protones metílicos, entre 5 y 6 ppm se observan dos singuletes que integran para los dos protones vinílicos, entre 7 y 8.5 ppm se observan una serie de señales que integran para los protones presentes en el anillo aromático, finalmente a 9.34 ppm se observa un singulete que integra para el protón del ácido carboxílico presente en la molécula.

III.3. Preparación de hidrogeles de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (MAOB-Propranolol).

Una vez sintetizado y caracterizado el monómero de MAOB, se procedió a preparar los hidrogeles, mediante el método de polimerización vía radicales libres (**Figura 22**). Las primeras formulaciones de hidrogeles se realizaron solo con cargado *in situ* del monómero, para un posterior cargado de propranolol mediante el método de relajación o apertura de las cadenas poliméricas del hidrogel. La cual

consistió en colocar dentro de una solución de cargado de propranolol a una concentración de 0.04 mg/mL el hidrogel con cargado *in situ* de monómero durante 24 horas. Sin embargo, se tuvieron problemas al llevar a cabo esta metodología, debido a que al exponer el hidrogel a la solución de cargado, el monómero se hidroliza y libera ácido salicílico a la solución, dificultando el cargado de propranolol en el hidrogel, por lo cual se tomó la decisión de realizar otra metodología para el cargado de propranolol.

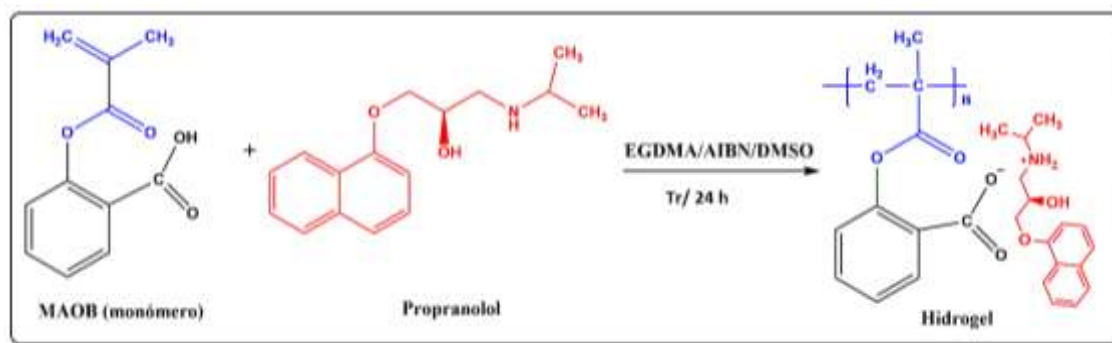


Figura 22. Esquema representativo de síntesis de hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%.

Para las próximas síntesis de hidrogeles se propuso la incorporación de propranolol de manera *in situ* durante el proceso de gelificación. En el cual se disminuyó la cantidad de monómero proporcional a la cantidad de propranolol a adicionar, manteniendo las mismas condiciones y concentraciones de iniciador, entrecruzante y disolvente. Bajo estas condiciones se logró obtener de manera exitosa un hidrogel cargado de manera *in situ* de monómero de MAOB y propranolol. El hidrogel que se obtuvo presentaba una consistencia característica pero débil, ya que al tratar de separarlo de las placas silanizadas, este sufría de pequeñas fracturas en el perímetro, además de presentar cierta adherencia a dichas placas. Después del lavado con metanol y un reposo de 1 semana, el hidrogel se tornó de una consistencia más rígida, teniendo una apariencia traslúcida.

III.3.1. Caracterización por Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Para llevar a cabo esta prueba se colocó una pequeña parte del hidrogel sintetizado en el equipo (thermo scientific modelo thermo Nicolet IS5), en el cual se obtuvo el siguiente espectro (**Figura 23**):

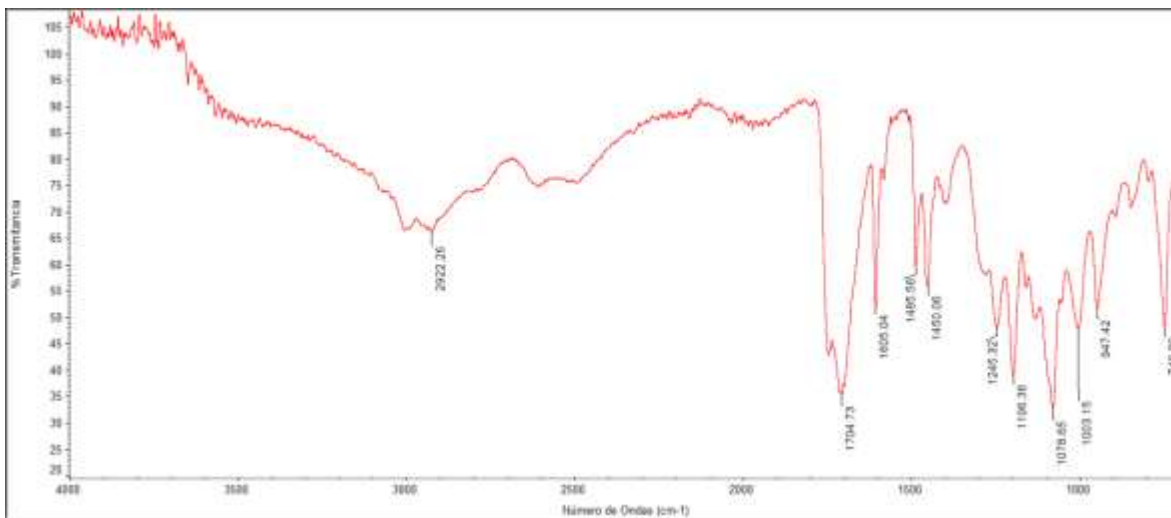


Figura 23. Espectro de infrarrojo de hidrogel de MAOB – Propranolol 0.5%.

Una de las primeras señales es aparecer es a 2922.26 cm^{-1} donde se observa una señal de intensidad baja perteneciente al estiramiento C-H (alifático), a 1704.73 cm^{-1} se observa una señal de intensidad fuerte asociada a la vibración del estiramiento C=O (ácido carboxílico), a 1605.04 cm^{-1} una señal de intensidad media asignada al estiramiento C=C (aromático), entre $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$ se observan señales de intensidad fuerte asociadas al estiramiento C-O (Éster), finalmente a 746.89 cm^{-1} se observa una señal de intensidad fuerte, que se asignó al estiramiento C-H, encontradas comúnmente en los anillos aromáticos sustituidos.

A la par se obtuvo el espectro de infrarrojo del propranolol (**Figura 24**) utilizado en la formulación del hidrogel, con el fin de corroborar las bandas características presentes en su estructura:

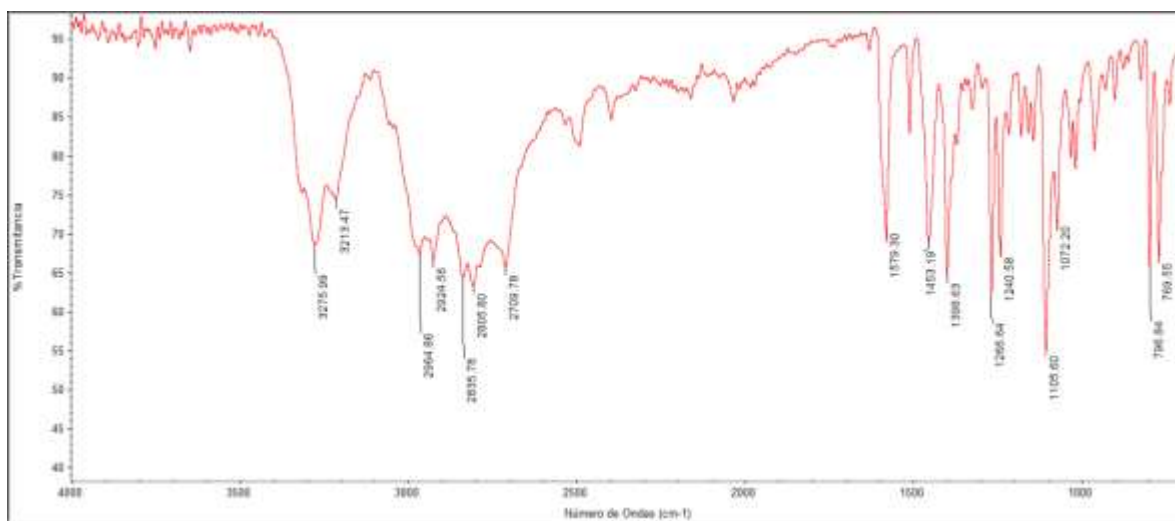


Figura 24. Espectro de infrarrojo de estándar de propranolol.

A 3280 cm^{-1} se observa una banda de intensidad baja asociada al estiramiento – N-H (amina secundaria), a 3275.99 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media asociada al estiramiento O-H, a 2964.86 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media asociada al estiramiento C-H, a 1579.30 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media asociada al estiramiento C=C (aromático), a 1240.58 se observa una banda de intensidad media asociada al estiramiento asimétrico del arilo O-CH₂, a 79.84 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media asociada al naftaleno alfa-sustituido.

III.3.2. Comparación de espectros de infrarrojo de monómero de MAOB, propranolol e hidrogeles de MAOB-Propranolol.

Una vez obtenido los espectros de infrarrojo de cada material por separado, se realizó una comparación de las sustancias puras utilizadas en la síntesis del hidrogel (MAOB, Propranolol) con el hidrogel sintetizado, con el fin de caracterizar

ciertos grupos funcionales que puedan estar presenta en la estructura del hidrogel, se obtuvo el siguiente gráfico (**Figura 25**):

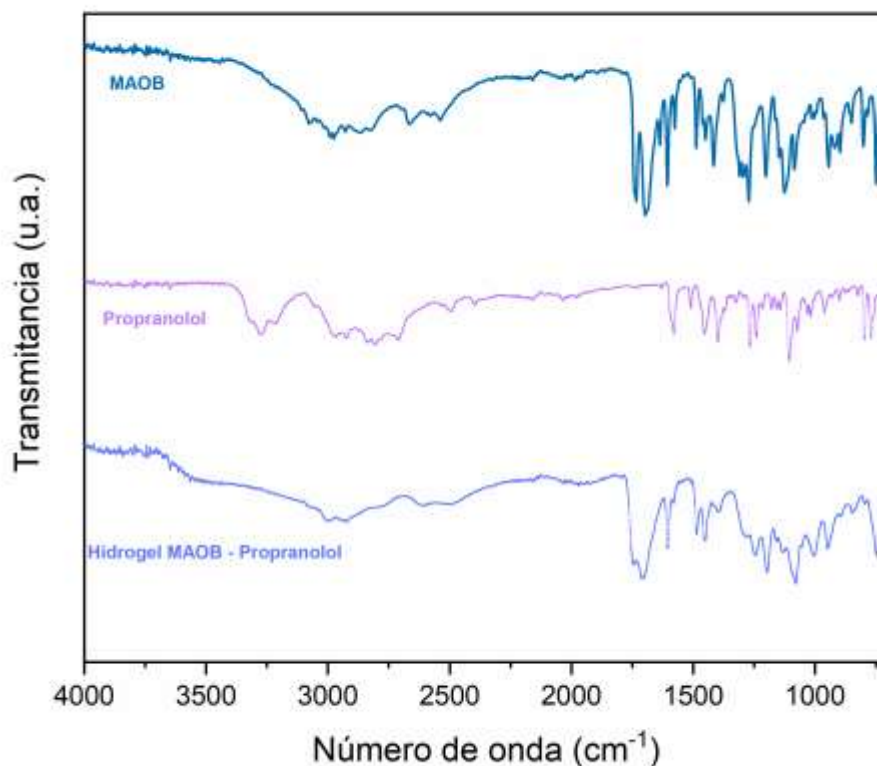


Figura 25. Gráfico comparativo de MAOB, Propranolol e Hidrogeles de MAOB – Propranolol 0.5%.

Como podemos observar en el gráfico, ambas sustancias puras (MAOB y Propranolol), presentan bandas características en longitudes de ondas similares, por lo cual hace difícil la detección de bandas características en la estructura del hidrogel. Con base en estos resultados se llega a la conclusión de que la técnica de FTIR-ATR, no es selectiva para este tipo de muestra, se recomienda utilizar otro método de caracterización para corroborar la presencia de ambas sustancias en el hidrogel.

III.4. Estudio de hinchamiento

Los hidrogeles de monómero de MAOB, se clasifican como hidrogeles polielectrolitos aniónicos, los cuales contienen grupos ácidos débiles (-COOH) en los sustituyentes laterales de la cadena principal. Este tipo de hidrogeles presentan como característica principal la capacidad de responder a estímulos externos, con base a esta capacidad se puede llegar a la conclusión que es fisiológicamente sensibles. Algunos de los estímulos a los cuales pueden presentar respuesta son al pH y temperatura.

El mecanismo de hinchamiento está dado por el aumento del pH en el medio de prueba, provocando un incremento en el grado de ionización en la red polimérica del hidrogel, ocasionando un relajamiento en las cadenas poliméricas, que en conjunto con la generación de contraiones móviles dentro del hidrogel (aumento de la presión osmótica), se induce a la fase de hinchamiento.

Para llevar a cabo la prueba, se utilizaron dos diversas variaciones, se utilizaron dos diferentes medios con pH 5.5 (pH de la piel) y pH 7.4, y variaciones en la temperatura 25°C y 37°C. El análisis del grado de hinchamiento se determinó utilizando la siguiente la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100$$

Donde Q es el grado de hinchamiento expresado en porcentaje, W_h es el peso del hidrogel hinchado en un tiempo determinado y W_s es el peso del hidrogel seco.

III.4.1. Estudio de hinchamiento a 37°C

Una vez calculado el grado de hinchamiento se obtuvo el siguiente gráfico (**Figura 26**), donde se muestran los resultados obtenidos en la prueba de hinchamiento a 37°C en los diferentes medios utilizados en un intervalo de tiempo de 72 horas.

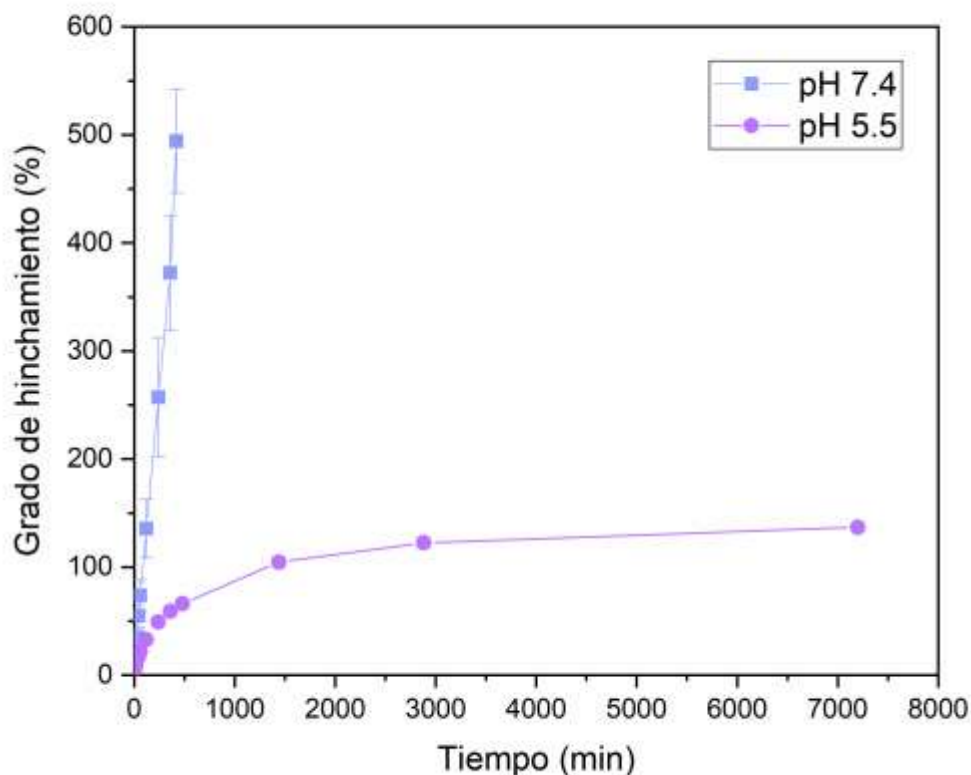


Figura 26. Gráfico comparativo de grado de hinchamiento con respecto al tiempo en los diferentes pH's a 37°C.

Como podemos apreciar en el gráfico, el hidrogel de MAOB – Propranolol 5%, presenta una transición mayor a pH más alcalinos (7.4), mientras que a pH más bajos o más ácidos (5.5) el hinchamiento es más lento. Ya que a pH 7.4 se observa un grado de hinchamiento de alrededor de 500% dentro de las primeras 8 horas de estudio, mientras que a pH 5.5 se obtiene un grado de hinchamiento de alrededor de 137% durante las 72 horas de estudio. Cabe mencionar que los hidrogeles expuestos a pH 7.4, no se pudo seguir con el estudio después de las 8

horas, ya que a las 24 horas los hidrogeles se rompieron debido al hinchamiento tan grande que presentaban.

III.4.2. Estudio de hinchamiento a 25°C

De igual manera, una vez calculado el grado hinchamiento, se obtuvo el siguiente gráfico (**Figura 27**), donde se muestran los resultados obtenidos en la prueba de hinchamiento a 25°C, en un intervalo de 72 horas de estudio.

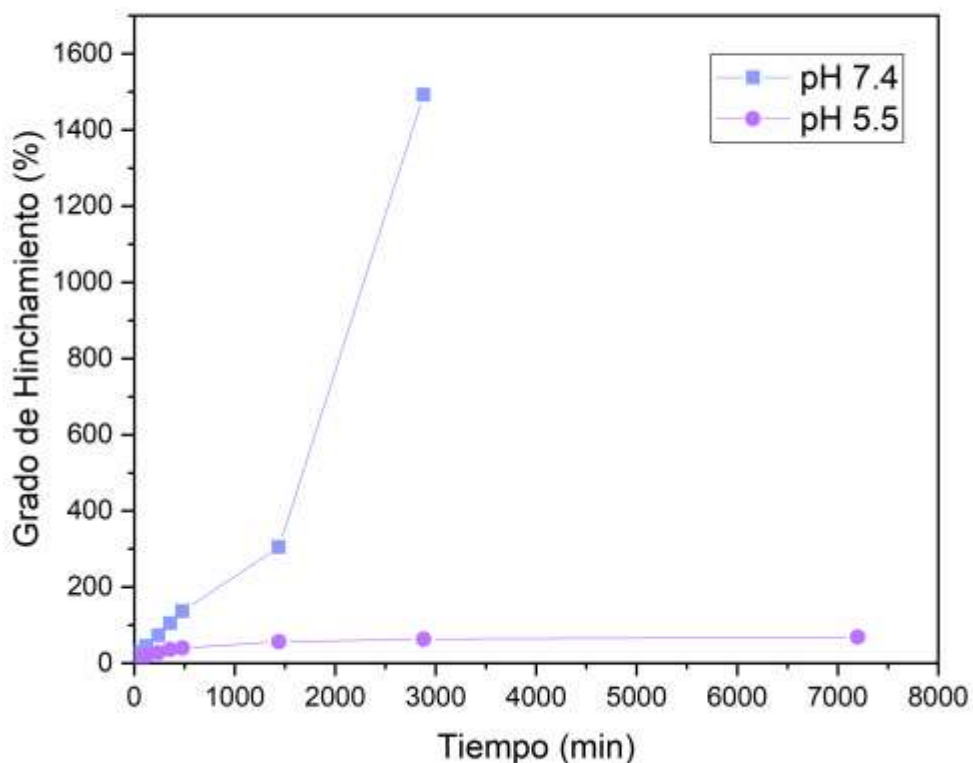


Figura 27. Gráfico comparativo de grado de hinchamiento con respecto al tiempo en los diferentes pH's a 25°C.

Como podemos observar en el gráfico, el hidrogel de MAOB – Propranolol al 5%, presenta un mayor grado de hinchamiento a pH 7.4, obteniendo un promedio de hinchamiento de 300% dentro de las primeras 24 horas de estudio, mientras que a

pH 5.5 se observa un grado de hinchamiento menor, obteniendo un promedio de hinchamiento de 68% dentro de las 72 horas de estudio, confirmando que los hidrogeles son sensibles a pH's más altos (7.4).

III.4.3. Comparativo de prueba de hinchamiento en diferentes condiciones.

Se obtuvo el siguiente gráfico comparativo (**Figura 28**), donde se evalúa el comportamiento presentado de los hidrogeles en las diferentes condiciones utilizadas en el estudio:

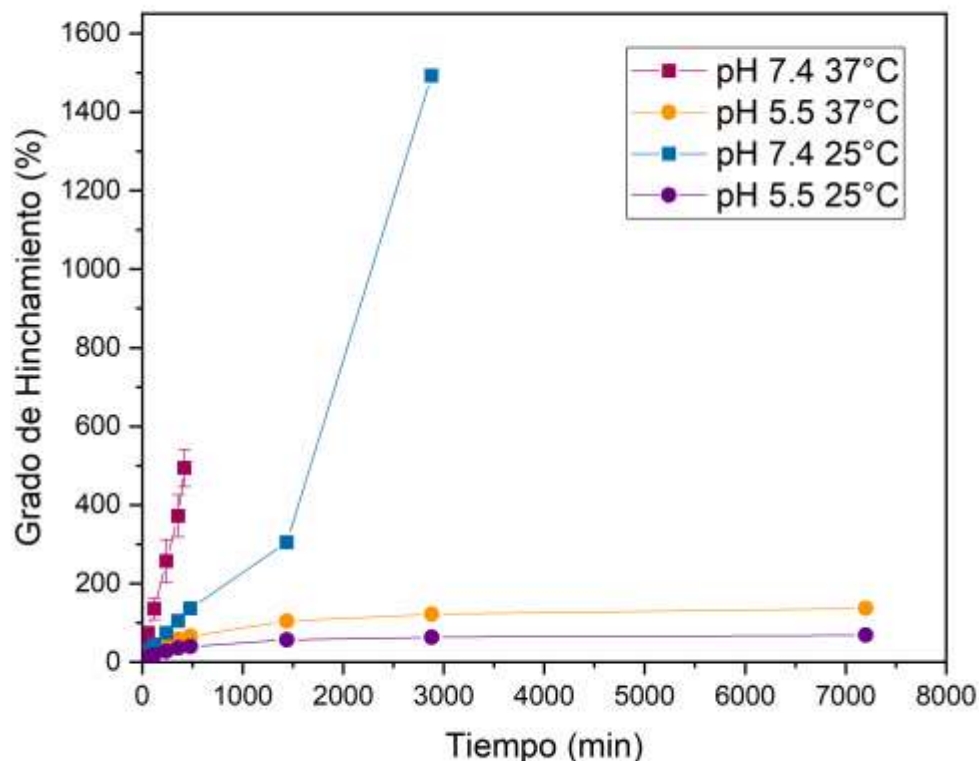


Figura 28. Gráfico comparativo de grado de hinchamiento con respecto a las variaciones de pH y temperatura.

Como podemos observar en el gráfico, los hidrogeles de MAOB – Propranolol al 5%, presentan un grado de hinchamiento mayor a temperaturas más altas (37°C) y pH's más altos (7.4). En el caso de la temperatura, podemos observar un

comportamiento exponencial y lineal en el hidrogel a una temperatura de 37°C, teniendo un promedio en el grado de hinchamiento de un 500% a pH 7.4 después de 8 horas de estudio, para el hidrogel a pH 5.5 se obtuvo un promedio de 137% después de 72 horas de estudio. Para el hidrogel a una temperatura de 25°C, se observa un comportamiento diferente, generando un grado de hinchamiento menor, teniendo como resultado un promedio en el grado de hinchamiento de alrededor de 300% a pH 7.4 después de 24 horas de estudio, mientras que a pH 5.5 se obtuvo un promedio de 68% después de 72 horas de estudio. Estos resultados demuestran que los hidrogeles presentan respuesta a estímulos fisiológicos tales como la temperatura y el pH, dando hincapié a que puedan ser utilizados como una matriz para una liberación dirigida y controlada de fármacos.

III.5. Estudio de hidrólisis – liberación y cuantificación de fármaco a través de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

El estudio de hidrólisis – liberación en medios de buffers simulados, se realizó con el fin de observar el comportamiento del hidrogel (**Figura 29**), y corroborar si son estímulos – respondientes cuando son sometidos a diferentes condiciones, como un cambio en la temperatura o el pH. Para llevar a cabo esta prueba se colocó a una temperatura de 37°C (temperatura corporal promedio), y a dos diferentes pH's, a pH 7.4, este pH fue seleccionado tomando como referencia la prueba de hinchamiento, en el cual se muestra un mayor grado de hinchamiento y por ende una mejor liberación de los fármacos, y a pH 5.5, ya que es el pH reportado de la piel. Con esta prueba podemos observar el tipo de liberación que se lleva a cabo a través de este sistema.

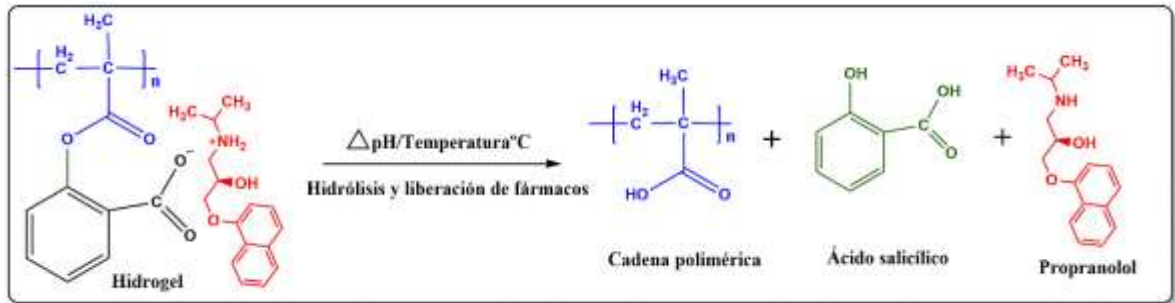


Figura 29. Esquema representativo del proceso de hidrólisis – liberación de hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%.

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron hidrogeles de MAOB – Propranolol al 5%.

III.5.1. Liberación a pH 7.4

Como podemos observar en el gráfico (**Figura 30**) para ácido salicílico, se presenta una liberación de tipo sostenida, donde dentro de la primeras 8 horas de estudio se observa una liberación constante de ácido salicílico, llegando a liberar hasta 10 mg de fármaco. Transcurridas las 24 horas de liberación, podemos observar un cambio significativo en canto a la cantidad de fármaco liberada, ya que se alcanzan a liberar en promedio 22 mg, siendo más del doble de fármaco liberado con respecto a las 8 horas de estudio. Cumplidas las 48 horas de liberación, se logran cuantificar en promedio 31 mg de fármaco. Finalmente, después de 72 horas de estudio se obtiene un promedio liberado de 34 mg de ácido salicílico.

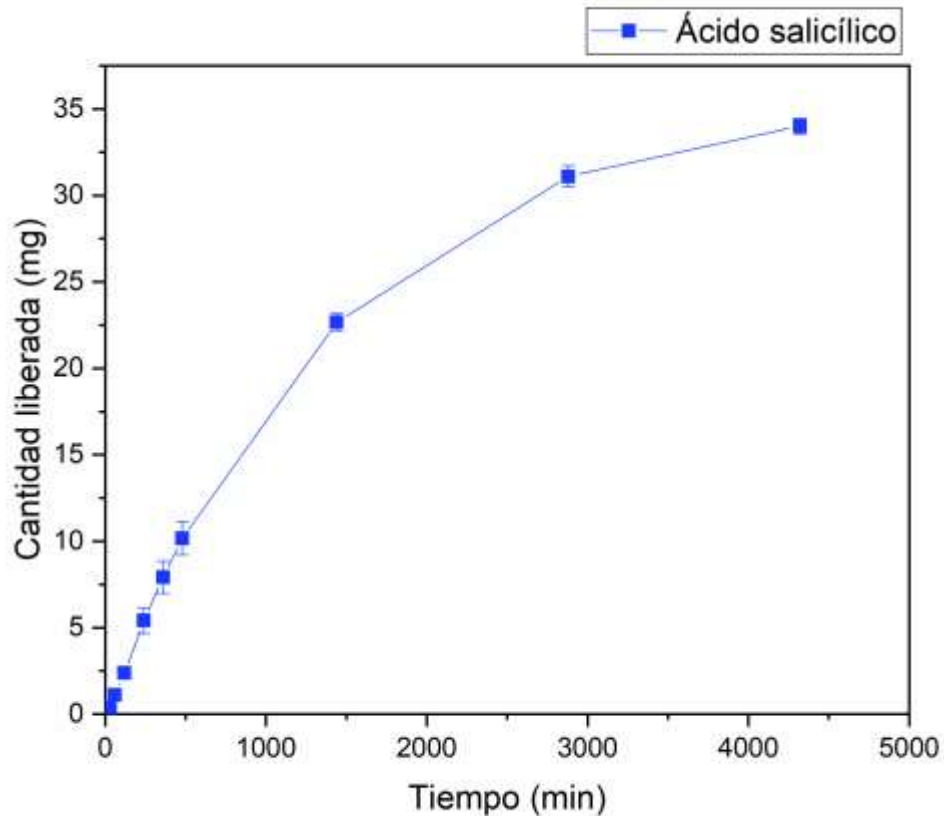


Figura 30. Gráfico de cinética de liberación para el fármaco ácido salicílico a pH 7.4.

Para el caso de propranolol (**Figura 31**), se observa un comportamiento similar al mostrado por el ácido salicílico, sin embargo dentro de las primeras dos horas de estudio se observa una liberación moderada de fármaco, obteniendo una liberación promedio de 6.5 μg . A partir de las 4 horas de estudio podemos observar una señal analítica considerable de propranolol, obteniendo en promedio 12.4 μg de fármaco liberado. Al cumplirse las 8 horas de estudio, se puede observar un aumento de fármaco liberado, llegando a 24.3 μg de fármaco. Cumplidas las 24 horas de estudio se observa un decrecimiento en cuanto a la cantidad de fármaco de liberado, obteniendo un resultado de 18.3 μg de fármaco, esto se asocia a dos posibles causas, a una mala toma de la alícuota, o que, lo que resta de fármaco se quedó atrapado dentro del filtro utilizado al momento de colocar la solución en el vial de HPLC. Después de 48 horas de estudio se puede

volver a observar un aumento de fármaco liberado, llegando a 31.1 μg de fármaco en el medio. Finalmente, a las 72 horas de estudio, se obtiene una cantidad promedio de 35.5 μg de fármaco en el medio de liberación.

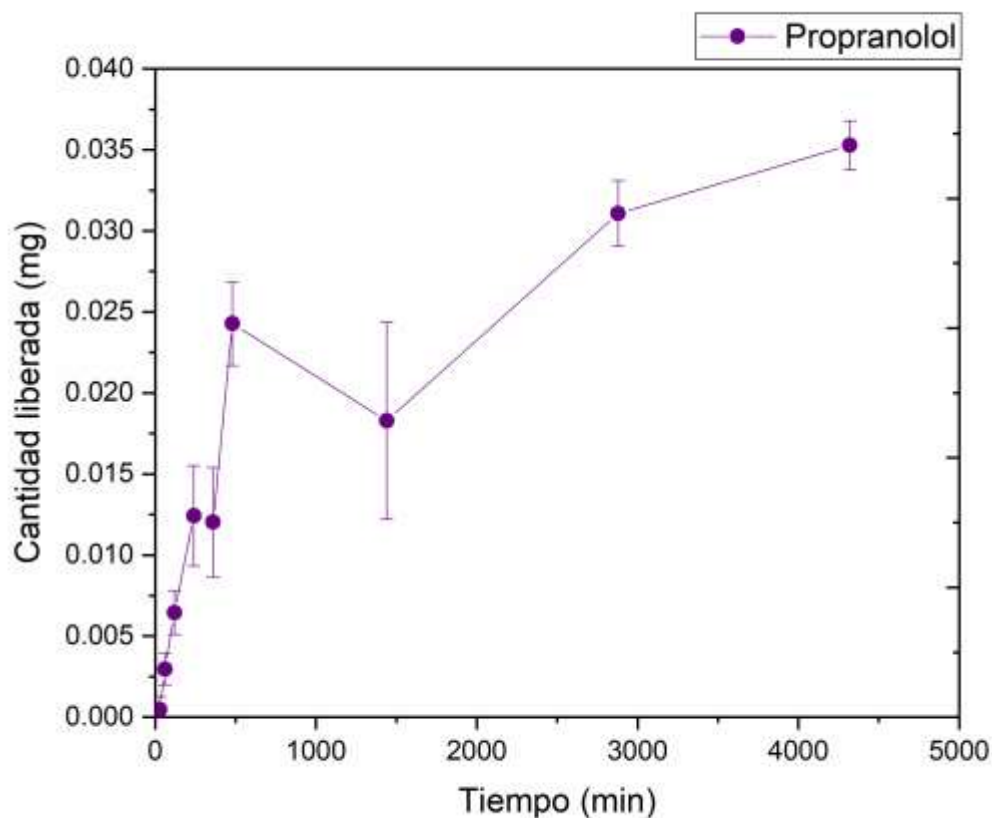


Figura 31. Gráfico de cinética de liberación del fármaco propranolol a pH 7.4.

Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en un estudio previo, donde se indican una liberación sostenida de fármaco bajo estas condiciones. Además de concordar con lo descrito en la prueba de hinchamiento realizada, donde se observa un aumento en el grado de hinchamiento con respecto al tiempo, comprobando que en cuanto más relajadas se encuentren las cadenas poliméricas del hidrogel, más cantidad de fármaco se va a liberar en el medio.

Comparando las cinéticas de liberación (**Figura 32**) de ácido salicílico y propranolol, se observa que ambos fármacos presentan una liberación sostenida, confirmando que tenemos un sistema polimérico con liberación controlada de fármacos a través de estímulos externos como temperatura y pH. Como podemos observar en el gráfico, la liberación de ácido salicílico es como se planteaba, siendo mayor en comparación a propranolol, esto debido a que la base para realizar la síntesis de estos hidrogeles es monómero de MAOB.

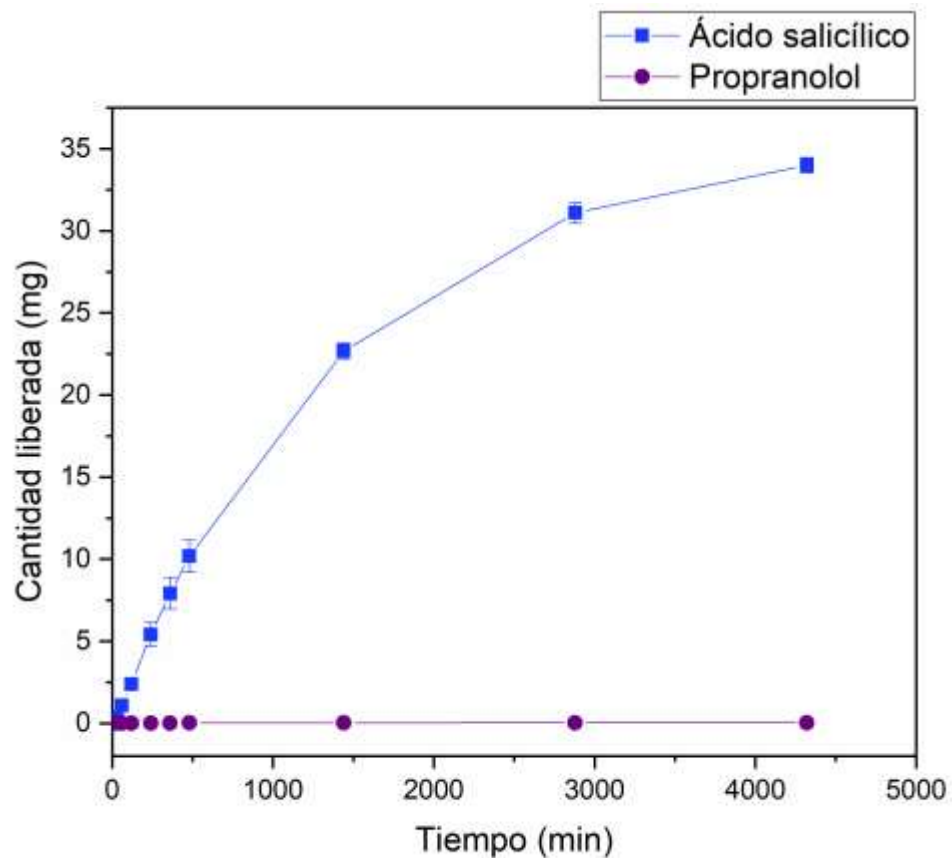


Figura 32. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de los fármacos ácido salicílico y propranolol.

III.5.2. Liberación a pH 5.5

La **Figura 33** nos muestra el comportamiento que se obtuvo durante las 72 horas de estudio. Como podemos observar en el gráfico, para ácido salicílico, se presenta una liberación sostenida de fármaco, donde dentro de las primeras 2 horas de estudio, se observa una liberación constante de fármaco, teniendo una liberación promedio de 2 mg. Cumplidas las 8 horas de estudio se obtiene una liberación promedio de 5 mg, siendo más del doble de fármaco liberado con respecto a las primeras dos horas de estudio. Transcurridas las 24 horas, se obtiene una liberación promedio de 9 mg. Cumplidas las 48 horas se logra una cuantificación promedio de 16 mg. Finalmente a las 72 horas de estudio se obtiene un promedio liberado de ácido salicílico de 20 mg.

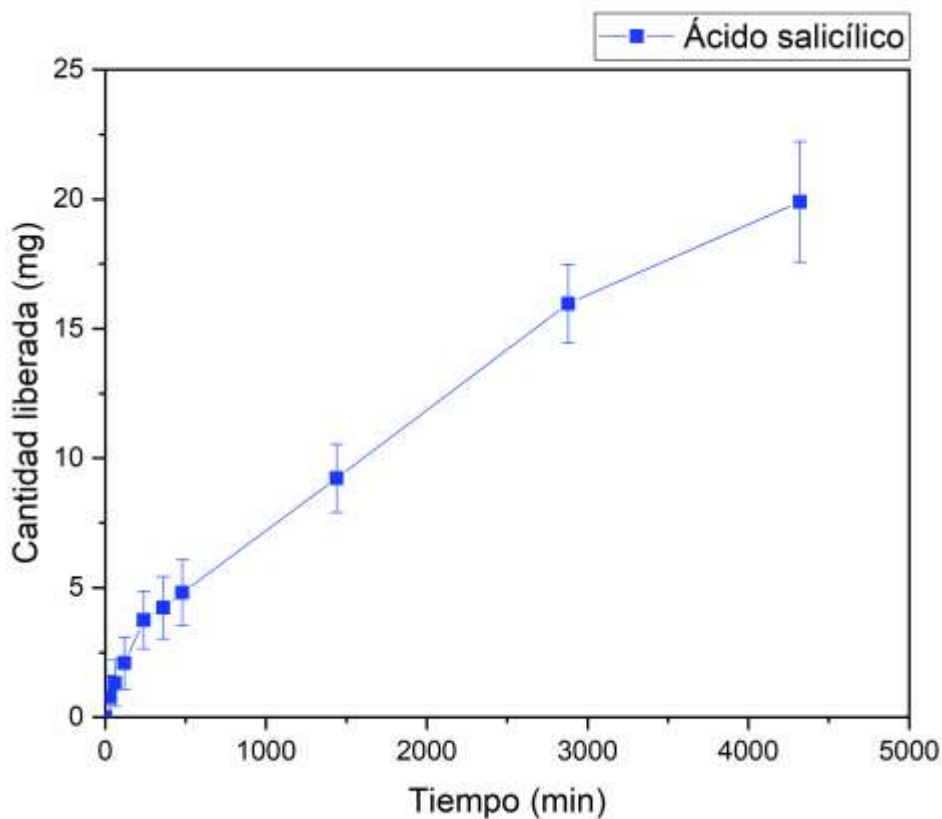


Figura 33. Gráfico de cinética de liberación para el fármaco ácido salicílico (pH 5.5).

El comportamiento mostrado para propranolol (**Figura 34**), es similar al observado para ácido salicílico y propranolol a pH 7.4, presenta una liberación sostenida de fármaco. A diferencia de la liberación a pH 7.4, dentro de las primeras dos horas de estudio se observa una liberación mayor de fármaco, teniendo una liberación promedio de 12 μg . A las 8 horas, se obtiene una liberación promedio de 24 μg . Transcurridas las 24 horas de estudio, se obtiene una liberación promedio de 53 μg . Después de 48 horas de estudio, se sigue observando un incremento en la cantidad liberada de fármaco, obteniendo un promedio de 104.1 μg . Finalmente, a las 72 horas de estudio, se obtiene una liberación promedio de 122.1 μg .

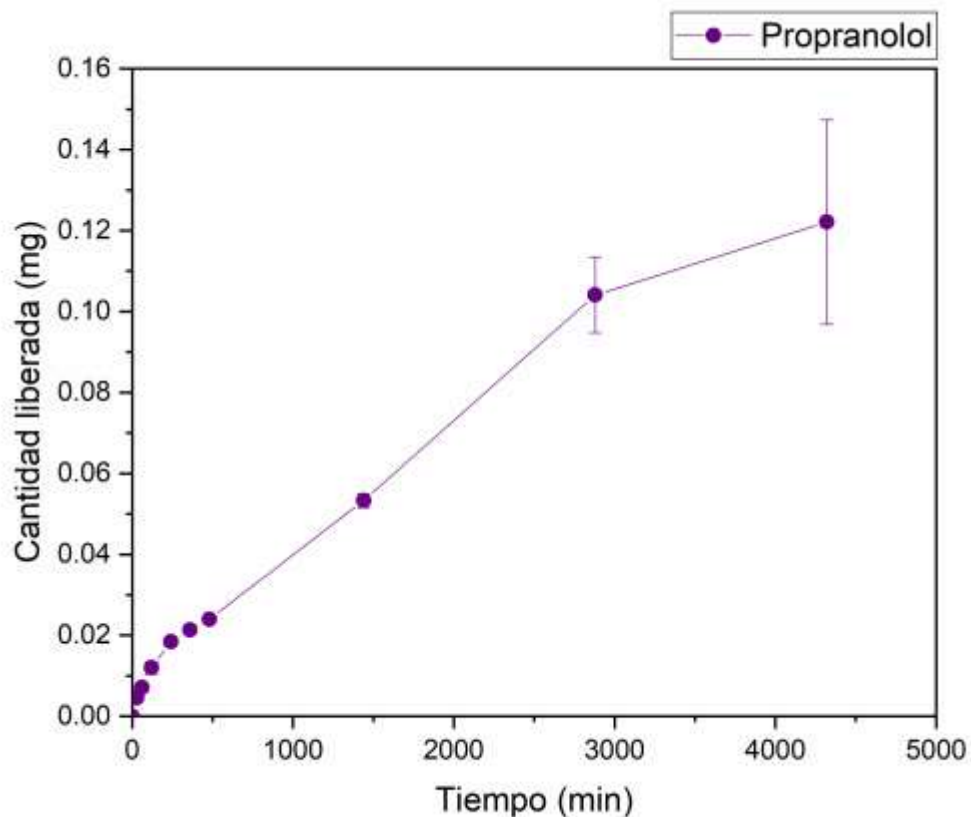


Figura 34. Gráfico de cinética de liberación para el fármaco propranolol (pH 5.5).

El comportamiento mostrado de ambos fármacos a pH 5.5 (**Figura 35**), es similar al mostrado a pH 7.4, la diferencia radica en la cantidad de fármaco liberado.

Ambos fármacos presentan una liberación tipo sostenida, confirmando que los hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%, presentan respuesta a estímulos fisiológicos como pH y temperatura. Además estos resultados nos indican las condiciones ideales para que se lleve a cabo una correcta liberación de fármacos.

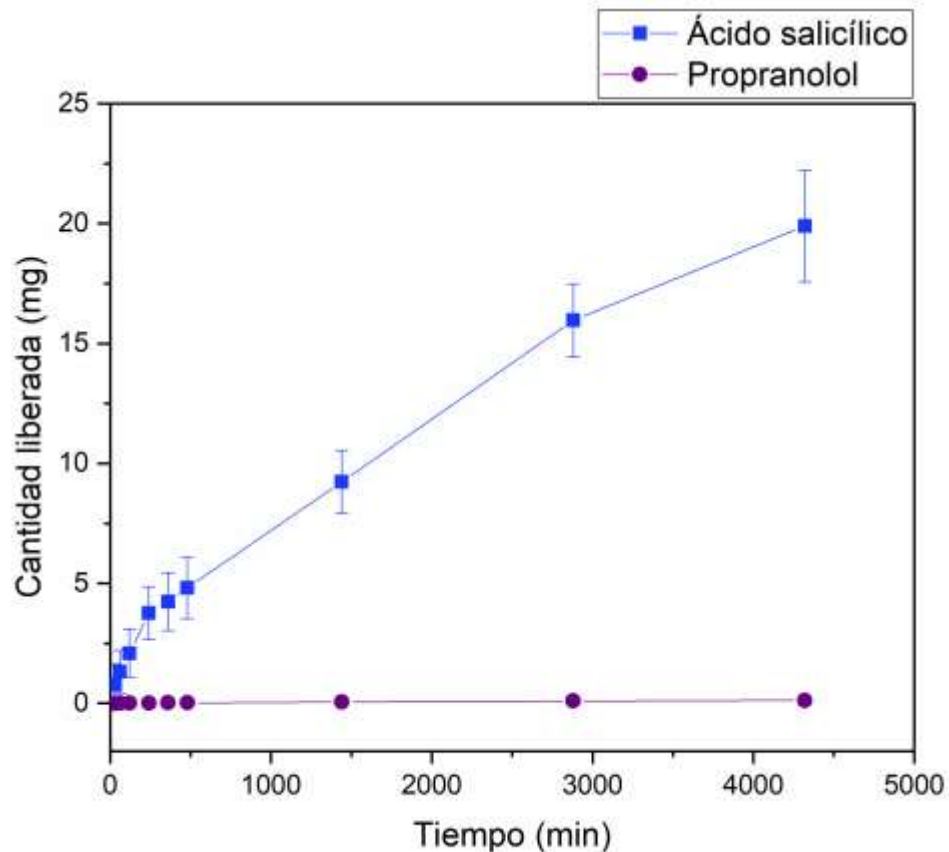


Figura 35. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de los fármacos ácido salicílico y propranolol pH 5.5.

Como podemos observar, en ambas liberaciones (pH 7.4 y pH 5.5) se observa una liberación de fármacos tipo sostenida, este comportamiento concuerda con lo reportado en una investigación previa de hidrogeles de MAOB. En el caso de ácido salicílico (**Figura 36**), podemos observar una mayor liberación a pH más altos o alcalinos (7.4), en comparación a pH bajos o ácidos (5.5), estos resultados se pueden explicar debido al grado de hinchamiento del hidrogel, ya que al igual que en la prueba de hinchamiento, se presenta un mayor grado de hinchamiento a

pH alcalinos, ocasionando una mayor apertura en las cadenas poliméricas presentes en la estructura, y por ende una mayor hidrolisis del poli(MAOB), liberando una mayor cantidad de ácido salicílico.

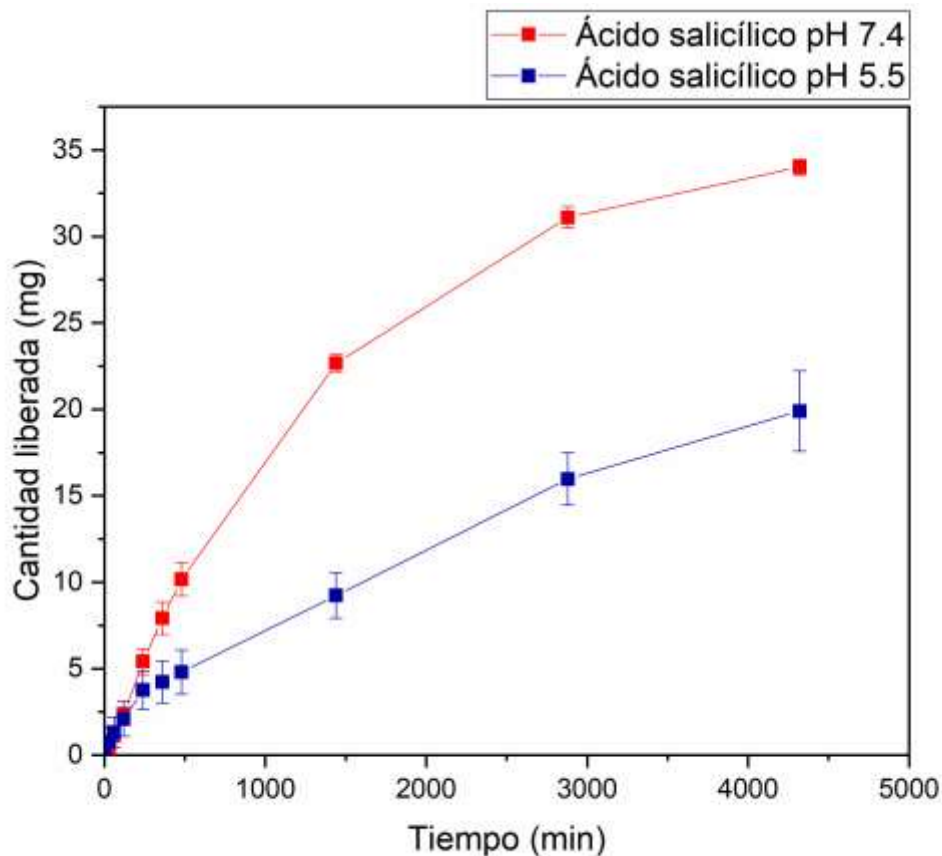


Figura 36. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de ácido salicílico a pH 7.4 y pH 5.5.

Para propranolol (**Figura 37**), presenta un comportamiento inverso al mostrado por ácido salicílico, ya que a pH 7.4, se obtiene una liberación menor en comparación que a pH 5.5, una posible explicación de estos resultados es que al momento de colocarla la muestra en un vial de HPLC se queda una parte atrapada dentro del filtro utilizado, por lo cual se sugiere repetir este experimento para corroborar los resultados obtenidos.

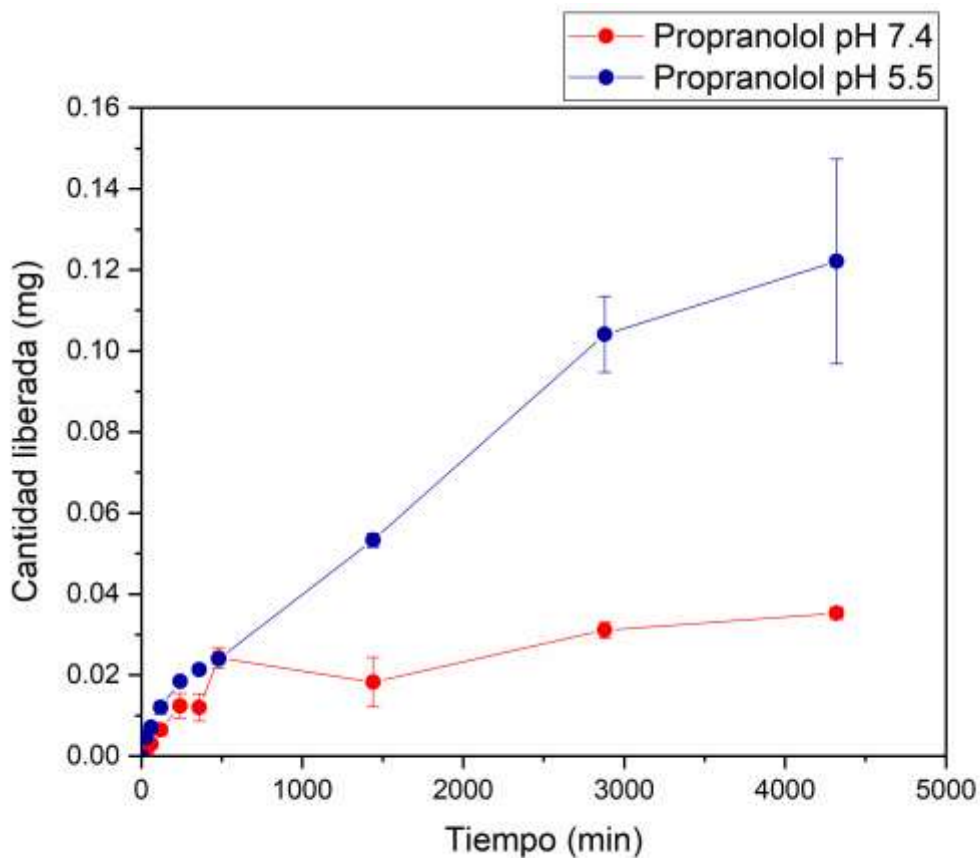


Figura 37. Gráfico comparativo de cinéticas de liberación de propranolol a pH 7.4 y pH 5.5.

Para verificar la presencia de los fármacos de interés, se analizaron estándares individuales de ácido salicílico (**Figura 38**) y propranolol (**Figura 39**), al igual que un estándar dual de dichos fármacos (**Figura 40**).

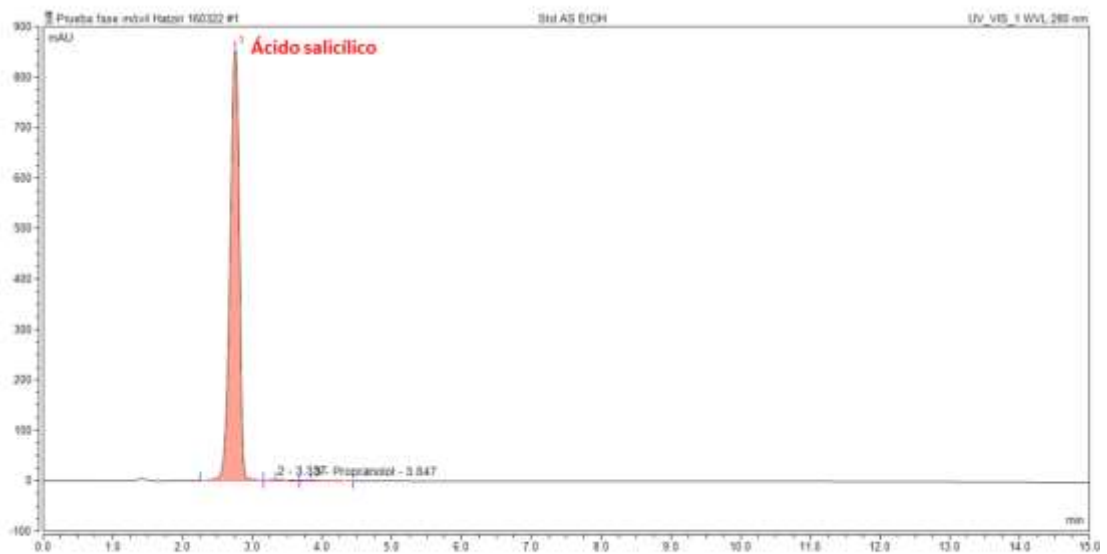


Figura 38. Estándar de ácido salicílico.

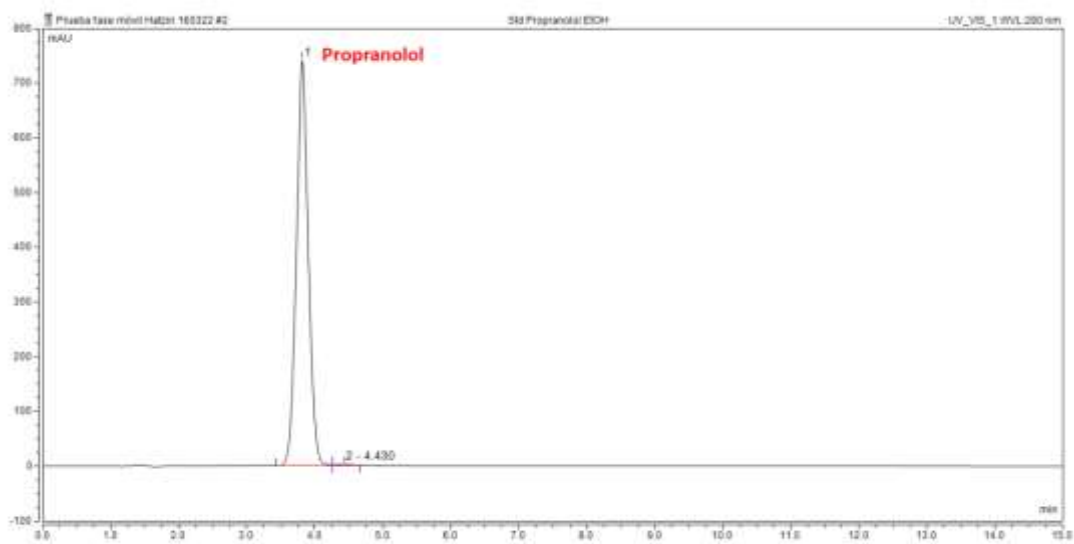


Figura 39. Estándar de propranolol.

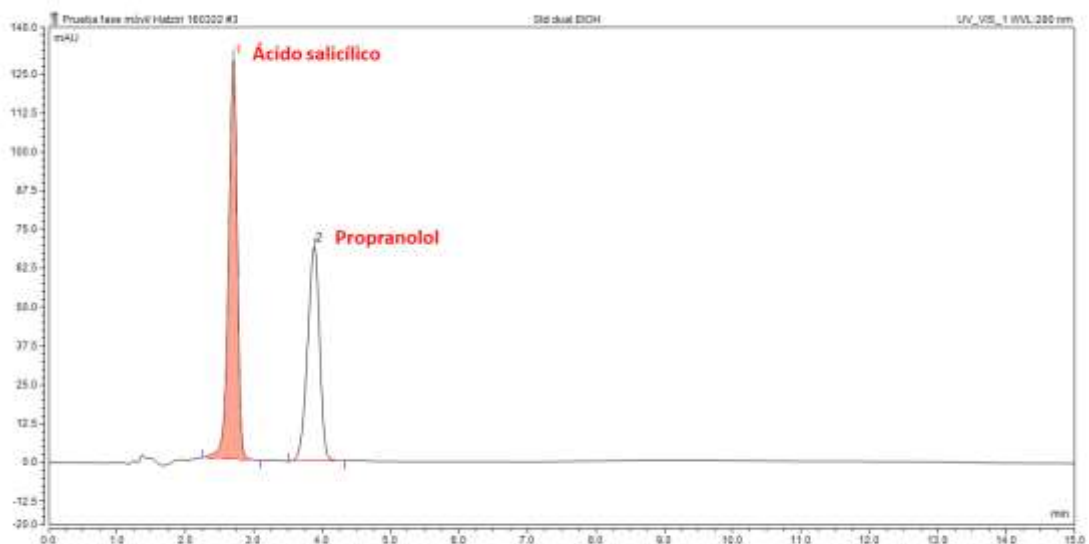


Figura 40. Estándar cargado con ácido salicílico y propranolol.

Posteriormente se compararon con las señales analíticas presentes en las diferentes liberaciones a pH 7.4, encontrando las señales analíticas correspondiente para ácido salicílico (**Figura 41**) y propranolol (**Figura 42**).

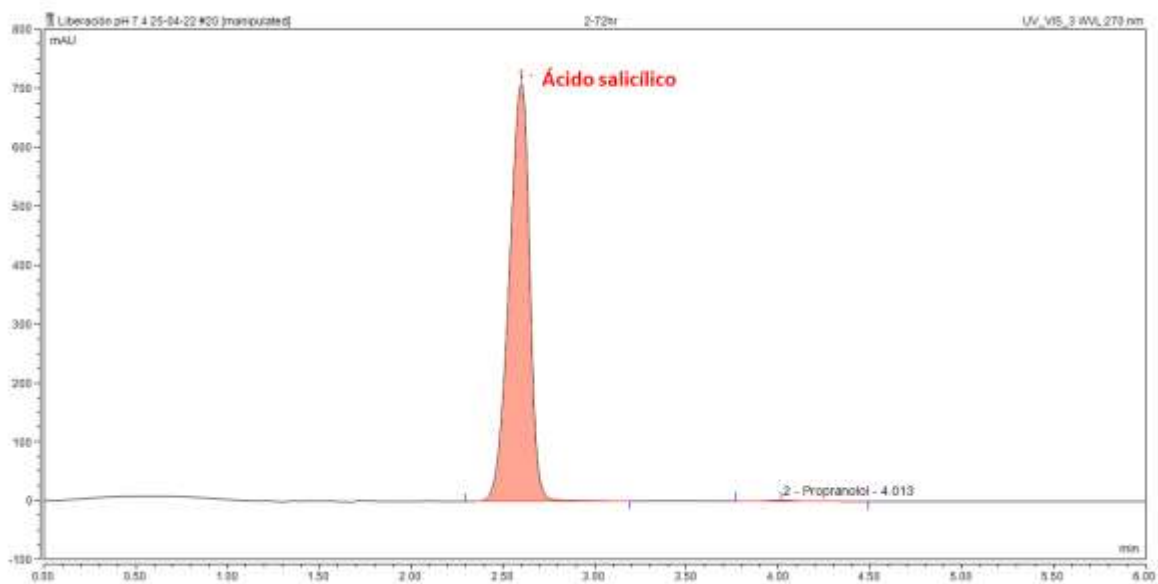


Figura 41. Cromatograma de muestra de liberación a pH 7.4, señal analítica correspondiente a ácido salicílico.

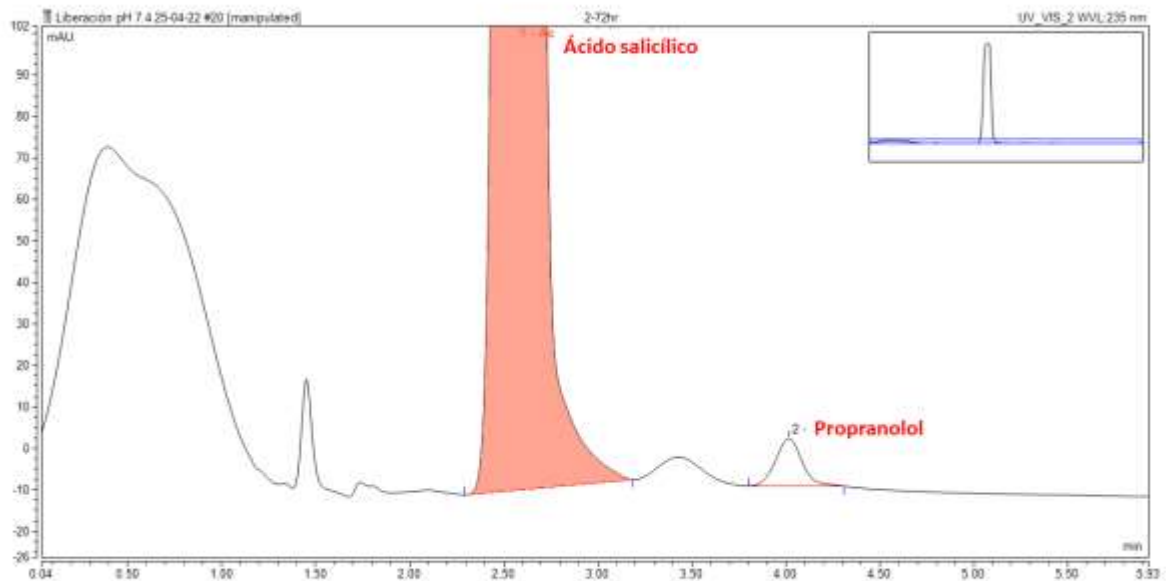


Figura 42. Cromatograma de muestra de liberación a pH 7.4, señal analítica correspondiente a propranolol.

II.6. Estudio de viabilidad celular

Se utilizaron 3 diferentes longitudes de onda (405, 450 y 620 nm) para llevar a cabo este estudio. Los resultados que se presentan a continuación, fueron evaluados a una longitud de onda de 620 nm. Además se utilizaron 3 diferentes concentraciones de fármaco propranolol (1, 2.5 y 5%), esto con el fin de evaluar si la cantidad de β – bloqueador influía en el porcentaje de viabilidad celular.

Para el caso de células de HeLa (**Figura 43**), como podemos observar en el gráfico, para el hidrogel al 1% de propranolol, se obtiene un promedio de 89.34%, para el hidrogel al 2.5% se obtiene un promedio de 108.96%, y para el hidrogel al 5% se obtiene un promedio de 99.90%. En el caso del hidrogel al 1% se presenta un porcentaje menor de viabilidad celular, esto se puede explicar debido a la cantidad de ácido salicílico presente en la formulación, ya que a menor concentración de propranolol, mayor concentración de ácido salicílico, lo cual generará una mayor liberación de ácido salicílico en el medio, cambiando el pH del

medio a ligeramente más ácido, lo que puede inducir una muerte celular. Los resultados obtenidos indican una buena viabilidad celular, ya que ninguno de los hidrogeles sintetizados presenta un porcentaje menor al 70%.

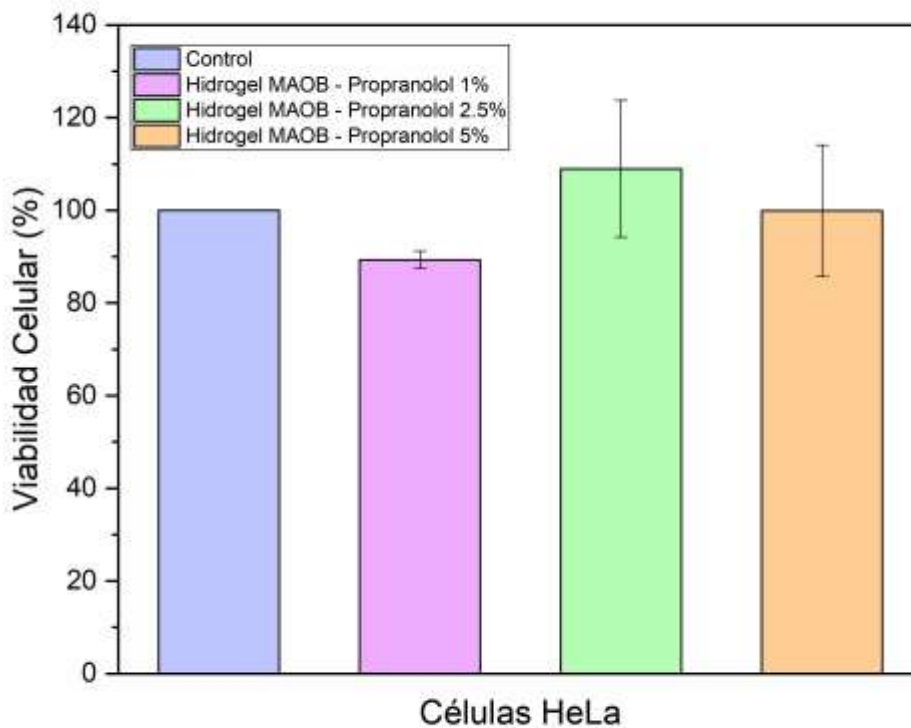


Figura 43. Gráfico de viabilidad celular, en células HeLa sometido a los diferentes hidrogeles sintetizados.

Para el estudio de fibroblastos (**Figura 44**), se observa que para el hidrogel al 1% se obtiene un promedio de 70.34%, para el hidrogel al 2.5% se obtiene un promedio de 90.29%, y para el hidrogel al 5% se obtiene un promedio de 124.09%. Como podemos observar, se presenta un comportamiento similar al mostrado en la prueba con células de HeLa, donde el hidrogel a menor concentración de propranolol (1%), muestra un porcentaje de viabilidad celular menor, este comportamiento se puede explicar de la misma manera, ya que al tener menor cantidad de propranolol, la cantidad de ácido salicílico liberada será

mayor, propiciando un cambio en el pH del medio de cultivo y una posterior muerte. A diferencia del estudio con células de HeLa, se puede decir que se tiene un porcentaje de viabilidad celular regular, ya que el hidrogel al 1% presenta un porcentaje de viabilidad celular cercano al 70%, indicando un proceso de muerte celular.

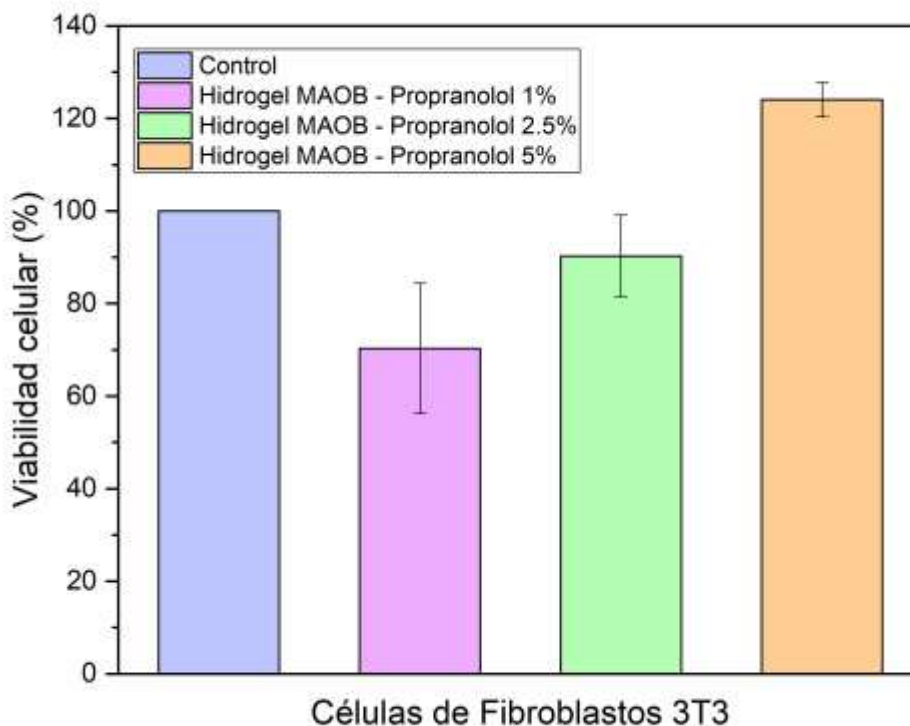


Figura 44. Gráfico de viabilidad celular, en Fibroblastos 3T3 sometido a los diferentes hidrogeles sintetizados.

El estudio con células de melanoma (**Figura 45**) muestra un comportamiento diferente con respecto al mostrado para células de HeLa y Fibroblastos 3T3. Para el hidrogel al 1% se obtiene un promedio de 64.73%, para el hidrogel al 2.5% se obtiene un promedio de 66.94%, y para el hidrogel al 5% se obtiene un promedio de 36.24%. Como podemos observar, en este caso el hidrogel que presenta un porcentaje de viabilidad celular menor, es el hidrogel al 5%, esto se puede explicar

debido al efecto que presenta el propranolol ante células cancerígena (melanoma), ya que en algunas investigaciones previas se reporta que el propranolol puede inducir la apoptosis en dichas células, y al presentar una concentración mayor de propranolol se propicia a inducir la muerte celular. Los resultados obtenidos en este estudio, indican que hay un porcentaje de viabilidad celular bajo, ya que los tres hidrogel presenta un promedio menor al 70%, que contrario a los estudios pasados (HeLa y Fibroblastos 3T3), estos se consideran resultados deseables, ya que indican un efecto positivo para inhibir el crecimiento de células cancerígenas.

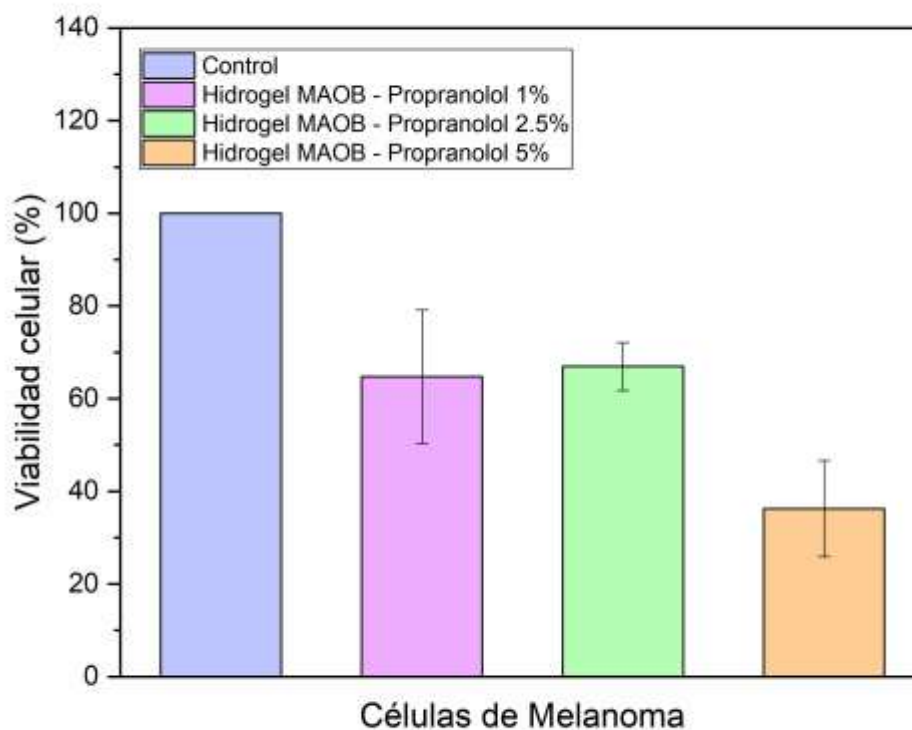


Figura 45. Gráfico de viabilidad celular, en células de melanoma sometido a los diferentes hidrogel sintetizados.

III.7. Estudio de evaluación de actividad antimicrobiana.

En este estudio se evaluó la respuesta antimicrobiana de los hidrogeles sintetizados, a dos diferentes microorganismos *E.coli* y *S.aureus*, esto con el fin de comprobar si el sistema desarrollado muestra cierta inhibición ante dichos microorganismos.

En la **tabla 2**, se muestran las absorbancias obtenidas después de 24 horas de incubación para *E.coli*, donde se obtiene un resultado promedio de inhibición de 3.3%. Para *S.aureus* (**tabla 2**) se muestra una inhibición nula (0%), estos resultados pueden ser indicativos que los hidrogeles no presentan actividad antimicrobiana, sin embargo se recomienda volver a realizar el estudio pero con ligeros cambios en la metodología utilizada, aumentando los días de incubación en los tubos con agar BHI, esto debido a que como se demostró en la prueba de hinchamiento y liberación, el sistema presenta una liberación controlada de fármacos, por lo que se puede asumir que aumentando el tiempo de incubación la liberación de fármacos será mayor y por ende un aumento en la inhibición, ya que en estudios previos y en la bibliografía se comenta que el ácido salicílico presenta actividad antimicrobiana.

Tabla 2. Absorbancias obtenidas después de 24 horas de incubación, para *E.coli* y *S.aureus*.

Muestra	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Tiempo		Tiempo	
	Inicial	24 horas	Inicial	24 horas
Blanco	0.000	0.000	0.000	0.000
Control negativo	0.000	0.022	0.000	0.022
Control positivo	0.052	0.629	0.055	0.602
Hidrogel 1	0.068	0.610	0.013	0.648
Hidrogel 2	0.068	0.607	0.029	0.574

CAPITULO IV. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar de manera exitosa el monómero de ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (MAOB) a partir de ácido salicílico y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) mediante un proceso de esterificación. Además el monómero sintetizado fue caracterizado utilizando diversas técnicas (FTIR, RMN-¹H, TLC) dentro de las cuales se identificaron grupos funcionales, protones (presentes en la estructura) y pureza del mismo, confirmando una correcta caracterización y síntesis.
2. Se logró encontrar las condiciones ideales para llevar a cabo una correcta síntesis del hidrogel de monómero de MAOB, con un cargado *in situ* de Propranolol, mediante el método de polimerización en disolución vía radicales libres en atmosfera inerte de nitrógeno. Para verificar un correcto cargado *in situ*, se realizó un estudio a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), obteniendo dos señales analíticas pertenecientes a los fármacos de interés (ácido salicílico y propranolol).
3. Se realizó un experimento del grado de hinchamiento en soluciones amortiguadoras a pH 5.5 y 7.4 a 37°C y 25°C, con el fin de observar el comportamiento que presenta el hidrogel sintetizado a variaciones de pH y temperatura. Los resultados obtenidos demostraron que los hidrogeles son sensibles a temperaturas más altas (37°C) y pH's más altos (pH 7.4), confirmando que los hidrogeles son respondientes a estímulos externos.
4. Se llevaron a cabo estudios de hidrólisis – liberación *in vitro* en un oscilador a 37°C, 100 rpm, con soluciones amortiguadoras a pH 5.5 y 7.4, durante 72 horas, las muestras obtenidas fueron analizadas y cuantificadas a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Los resultados obtenidos mostraron que pH más altos (7.4) se libera una mayor cantidad de ácido salicílico, obteniendo en promedio una liberación final de 34 mg. En el caso de propranolol, se observó un comportamiento inverso, mostrando una mayor liberación a pH's más bajos (5.5), teniendo un

promedio de liberación final de 122.1 µg. Los resultados obtenidos de la liberación concuerdan con lo observado en la prueba de hinchamiento, la cual mostró un mayor porcentaje de hinchamiento a pH 7.4, que a su vez da a lugar a una mayor liberación de fármacos, debido a que el pH del medio provoca que las cadenas poliméricas del hidrogeles se encuentran relajadas, facilitando y agilizando el proceso de hidrolisis - liberación, en contraste a pH 5.5 se observa un proceso de hidrolisis – liberación más lento, el cual se explica debido al pH del medio, que al ser más ácido genera un proceso más lento. Dichos resultados pueden tener un impacto positivo para su aplicación en piel (pH 5.5), ya que se puede tener una liberación de fármacos sostenido por un intervalo de tiempo de mayor, facilitando la administración de fármacos. Complementariamente se logró apreciar el tipo de cinética que presentan ambos fármacos, demostrando que el hidrogel presenta una liberación sostenida.

5. Para los estudios de viabilidad celular, se demostró que los hidrogeles de MAOB – Propranolol a diferentes concentraciones (1, 2.5, 5%), presentan un buen porcentaje de viabilidad celular, obteniendo resultados superiores al 70%, indicando una baja citotoxicidad para células cancerígenas (HeLa) y no cancerígenas (Fibroblastos 3t3). Adicionalmente al proyecto original, se evaluó la respuesta que tendría el hidrogel ante células cancerígenas de la piel (melanoma), obteniendo resultados inferiores al 70% de viabilidad celular, siendo el hidrogel con mayor concentración de propranolol (5%) el que menor porcentaje presenta, demostrando que los hidrogeles pueden ser una potencial aplicación para esta enfermedad.
6. Finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrogeles, en esta prueba se evaluaron 2 microorganismos diferentes, una bacteria gram negativa (*E.coli*) y una bacteria gram positiva (*S.aureus*), los resultados obtenidos mostraron una baja inhibición para el caso de *E.coli*, teniendo una inhibición promedio de un 3.3%, mientras que para *S.aureus* se

presentó una inhibición nula. Demostrando que los hidrogeles no presentan esta capacidad inhibitoria, con fines confirmatorios se recomienda volver a realizar esta prueba modificando el método utilizado para corroborar los resultados obtenidos.

Los hidrogeles de MAOB – Propranolol sintetizados, presentan la capacidad de responder a estímulos externos tales como pH y temperatura, teniendo un hinchamiento gradual con respecto al tiempo, lo cual permite ser utilizados como un sistema polimérico de liberación sostenida de ácido salicílico y propranolol. Los resultados obtenidos de la prueba de hinchamiento e hidrólisis – liberación demuestran una concordancia en cuanto a su comportamiento, obteniendo mejores resultados a pH y temperaturas superiores para ácido salicílico, en el caso de propranolol se observa un comportamiento diferente, teniendo una menor cantidad de fármaco liberado, la cual se puede deber a diferentes factores, tales como la cantidad utilizada al momento de realizar la síntesis del hidrogel, o el proceso de purificación del hidrogel, por lo que se sugiere realizar pruebas complementarias que corroboren los resultados obtenidos o se pueda mejorar la cantidad liberada de propranolol. Estos resultados confirman dos de las características más importantes de los hidrogeles como el hinchamiento y la respuesta a estímulos externos. Además el estudio de viabilidad celular demuestra resultados óptimos en las líneas celulares evaluadas, teniendo porcentajes mayores al 70% en dos tipos de células indicando una baja citotoxicidad, complementariamente se evaluó una línea celular de cáncer de piel, donde se observó la capacidad de reducir o detener el crecimiento de este tipo de células. Tomando en cuenta todos estos resultados se llega a la conclusión que los hidrogeles de poli(MAOB), pueden fungir como una matriz polimérica en la cual se puede cargar de manera *in situ* propranolol a diferentes concentraciones, los cuales pueden llegar a ser una alternativa en el tratamiento de hemangiomas infantiles.

CAPITULO V. ANEXOS



Figura 46. Monómero de ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (MAOB).

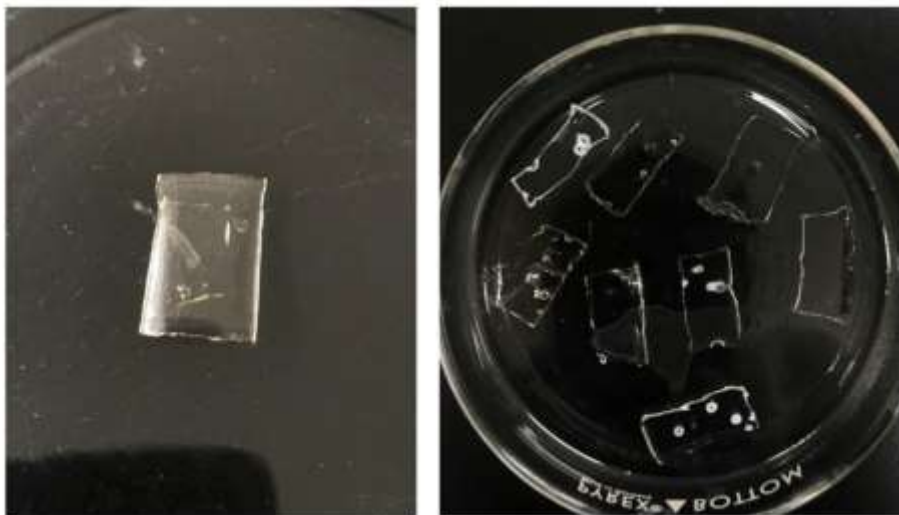


Figura 47. Hidrogeles de MAOB – Propranolol 5%.

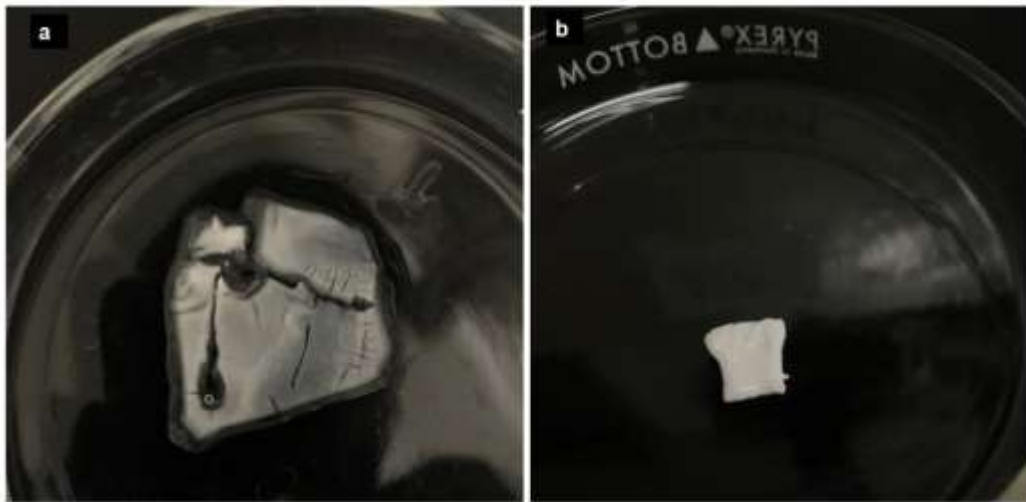


Figura 48. Hidrogel hinchamiento pH 7.4 a 37°C (a). Hidrogel hinchamiento pH 5.5 a 37°C (b).

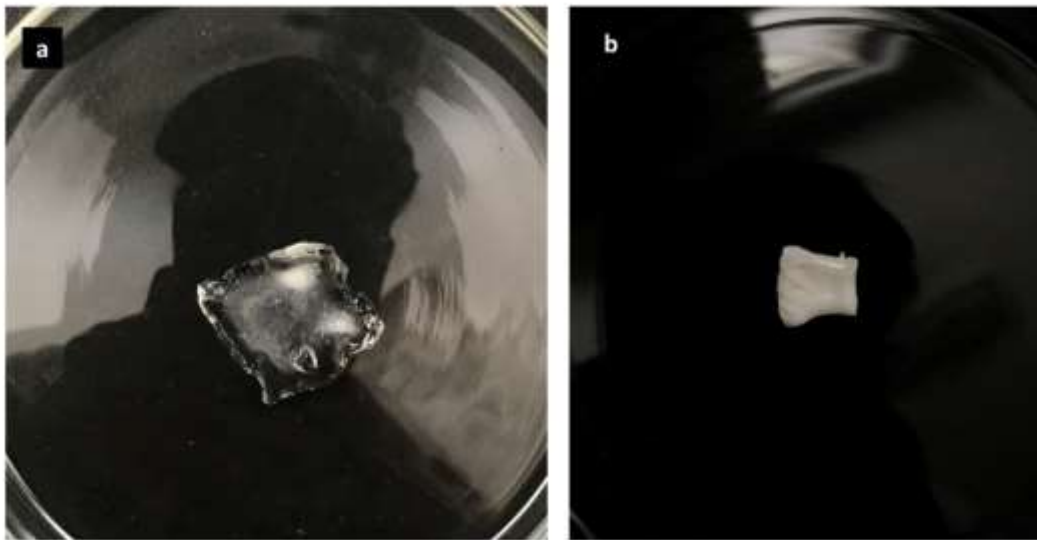


Figura 49. Hidrogel hinchamiento pH 7.4 a 25°C (a). Hidrogel hinchamiento pH 5.5 a 25°C (b).

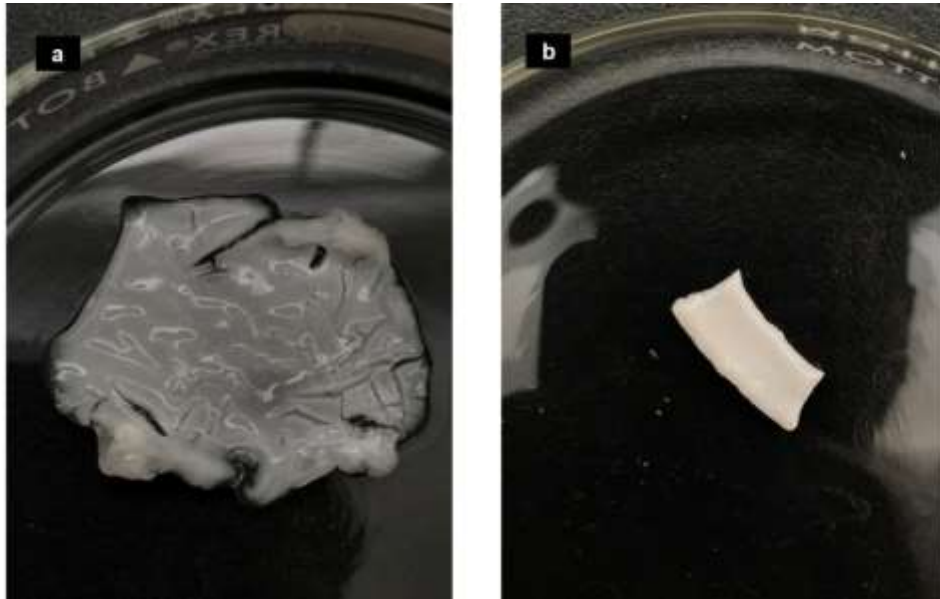


Figura 50. Hidrogel liberación pH 7.4 (a). Hidrogel liberación pH 5.5 (b).

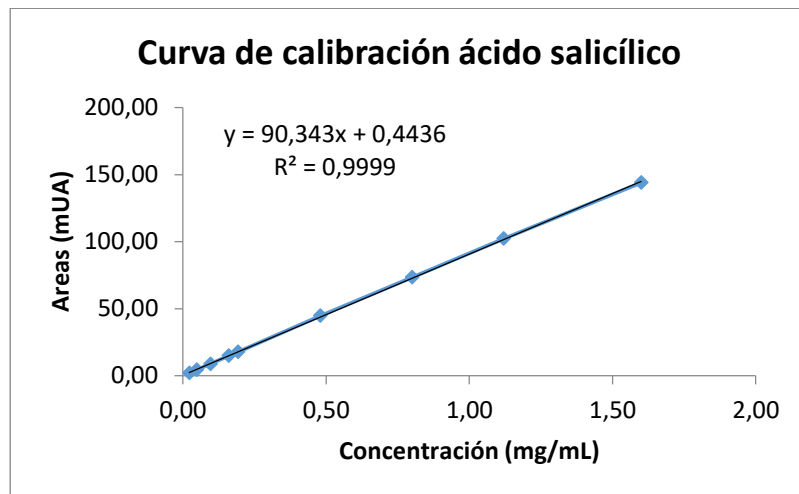


Figura 51. Curva de calibración de ácido salicílico a 280 nm.

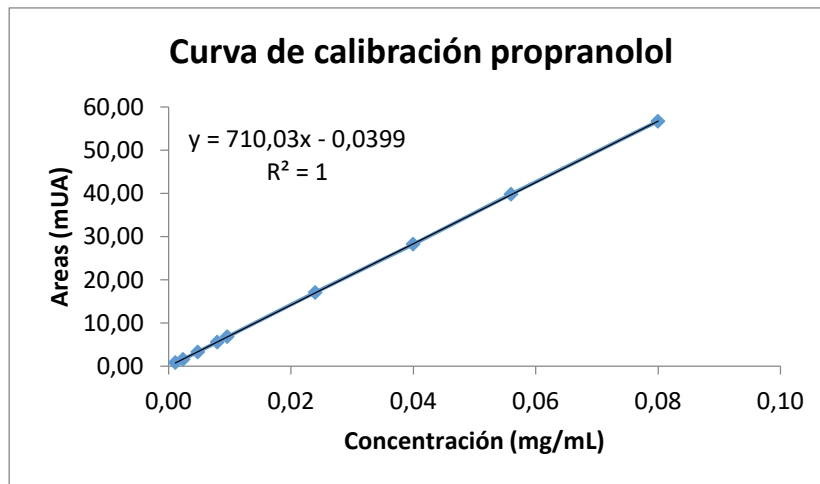


Figura 52. Curva de calibración de propranolol a 235 nm.

Bibliografía

1. Chen ZG, Zheng JW, Yuan ML, Zhang L, Yuan WE. A novel topical nano-propranolol for treatment of infantile hemangiomas. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2015;11(5):1109-1115. doi:10.1016/j.nano.2015.02.015
2. Turbert D. ¿Qué es un hemangioma? – American Academy of Nanotechnology. Published 2020. Accessed April 4, 2021. <https://www.aaonano.org/salud-ocular/enfermedades/que-es-un-hemangioma>
3. F C. Desarrollan en México un tratamiento efectivo y de bajo costo para el tratamiento del hemangioma infantil. | Código F. Published 2018. Accessed April 4, 2021. <https://codigof.mx/desarrollan-en-mexico-un-tratamiento-efectivo-y-de-bajo-costo-para-el-tratamiento-del-hemangioma-infantil/>
4. Frailea MDC, Torrelo A. Hemangiomas infantiles. *An Pediatr Contin.* 2017;8(6):294-298. doi:10.1016/S1696-2818(10)70052-4.
5. Singh J, Sharma P, Tandon S, Sinha S. Multiple verrucous hemangiomas: A case report with new therapeutic insight. *Indian Dermatol Online J* 2017;8:254-6.
6. Dreiss CA. Hydrogel design strategies for drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2020;48:1-17. doi:10.1016/j.cocis.2020.02.001
7. Sun Y, Nan D, Jin H, Qu X. Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polym Test.* 2020;81(December 2019):106283. doi:10.1016/j.polymertesting.2019.106283
8. Echeverri CE, Vallejo C, Londoño ME. Synthesis and Characterization of Polyvinyl Alcohol Hydrogels By Freezing/Thawing Technique for Medical Applications. *Rev EIA.* 2009;(12):59-66.

9. Arredondo Peñaranda A, Londoño López ME. Hidrogeles: Potenciales Biomateriales Para La Liberación Controlada De Medicamentos. *Rev Ing Biomédica*. 2009;3(5):83-94. doi:10.24050/19099762.n5.2009.70
10. Escarcega C., González A., Villalón C., Rodríguez M., Marichal B. (2019). β -Adrenoceptor Blockade for Infantile Hemangioma Therapy: Do β 3-Adrenoceptors Play a Role?. *Journal of Vascular Research*.
11. Rasha A., Usama F., Fatma M. (2021). Enhanced skin delivery of propranolol HCl using nonionic surfactant-based vesicles for topical treatment of infantile hemangioma. *Journal of Drugs Delivery Science and Technology*.
12. Páez A. Hormigón armado - Alfredo Páez - Google Libros. Published 1986. Accessed April 4, 2021. https://books.google.com.mx/books?id=5wfVaiKduB8C&pg=PA195&dq=monómero+s+y+polímeros&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwj2rL8i4zrAhU2CTQIHY_QDJoQ6AEwAXoECAIQAg#v=onepage&q=monómeros+y+polímeros&f=false
13. HERMIDA É. Capítulo 9: Polímeros. *Colección Mater y Mater primas*. Published online 2011:70. http://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/09_Polimeros.pdf
14. Beltrán M, Marcilla A. Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades - Google Libros. Published 2012. Accessed April 4, 2021. https://books.google.co.ve/books?id=jxilUUn4_QAC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false
15. Yining S., Ding N., Haiqiang J., Xiaozhong Q., (2020). Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *European Polymer Journal*.
16. Prajapati SK, Jain A, Jain A, Jain S. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *Eur Polym J*. 2019;120(March):109191.

doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018

17. George D, Maheswari PU, Begum KMMS. Chitosan-cellulose hydrogel conjugated with L-histidine and zinc oxide nanoparticles for sustained drug delivery: Kinetics and in-vitro biological studies. *Carbohydr Polym.* 2020;236(February). doi:10.1016/j.carbpol.2020.116101.
18. Burgos C, Cuadro AM, Alvarez-Builla J. Profármacos, ejemplos seleccionados del mercado español I. Profármacos unidos a transportador. *An Quim.* 2019;115(3):209-217.
<file:///C:/Users/denny/Downloads/PROFARMACOSANALES1vww.pdf>
19. Cabrera S, Díez-torrubia A. Profármacos: pasado, presente y futuro. *Investig Química.* 2010;106:207-214.
20. Cornejo-Bravo, J.M.; Palomino, K.; Palomino-Vizcaino, G.; Pérez-Landeros, O.M.; Curiel-Alvarez, M.; Valdez-Salas, B.; Bucio, E.; Magaña, H. Poly(N-vinylcaprolactam) and Salicylic Acid Polymeric Prodrug Grafted onto Medical Silicone to Obtain a Novel Thermo- and pH-Responsive Drug Delivery System for Potential Medical Devices. *Materials* 2021, 14, 1065.
<https://doi.org/10.3390/ma14051065>
21. Magaña, H.; Becerra, C.D.; Serrano-Medina, A.; Palomino, K.; Palomino-Vizcaíno, G.; Olivas-Sarabia, A.; Bucio, E.; Cornejo-Bravo, J.M. Radiation Grafting of a Polymeric Prodrug onto Silicone Rubber for Potential Medical/Surgical Procedures. *Polymers* 2020, 12, 1297. <https://doi.org/10.3390/polym12061297>
22. Muchová M, Münster L, Capáková Z, Mikulcová V, Kuřitka I, Vícha J. Design of dialdehyde cellulose crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for transdermal drug delivery and wound dressings. *Mater Sci Eng C.* 2020;116(June):111242. doi:10.1016/j.msec.2020.111242

23. Escalona O, Quintanar D. Nanogeles poliméricos: Una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2014;45(3):17-38. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000300003
24. Qureshi D, Nayak SK, Maji S, Anis A, Kim D, Pal K. Environment sensitive hydrogels for drug delivery applications. *Eur Polym J.* 2019;120:109220. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109220
25. Nezami S, Sadeghi M, Mohajerani H. A novel pH-sensitive and magnetic starch-based nanocomposite hydrogel as a controlled drug delivery system for wound healing. *Polym Degrad Stab.* 2020;179:109255. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109255
26. Mauri E, Salvati A, Cataldo A, et al. Graphene-laden hydrogels: A strategy for thermally triggered drug delivery. *Mater Sci Eng C.* 2021;118(August 2020):111353. doi:10.1016/j.msec.2020.111353
27. Torres-Luna C., Fan X., Domszy R., Hu N., Wang N., Yang A. (2020). Hydrogel-based ocular drug delivery systems for hydrophobic drugs. *European Journal of Pharmaceutical*
28. Martins dos Santos A., Goncalves Carvalho S., Sousa Aurajo V., Correa Carvalho G., Daflon Gremiao M., Chorilli M. (2020). Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. *International Journal of Pharmaceutics.*
29. Ailincăi D., Mititelu-Tartau L., Marin L. (2020). Citryl-imine-PEG-ylated chitosan hydrogels – Promising materials for drug delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules.*

30. Muchová M., Munster L., Capáková Z., Mikulcová V., Kuritka I., Vícha J. (2020). Design of dialdehyde cellulose crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for transdermal drug delivery and wound dressings. *Materials Science & Engineering*.
31. Afshar M., Dini G., Vaezifar S., Mehdikhani M., Movahedi B. (2020). Preparation and characterization of sodium alginate/polyvinyl alcohol hydrogel containing drug-loaded chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.
32. Jahanban-Esfahlan R., Derakhshankhah H., Haghshenas B., Massoumi B., Abbasian M., Jaymand M. (2020). A bio-inspired magnetic natural hydrogel containing gelatin and alginate as a drug delivery system for cancer chemotherapy. *International Journal of Biological Macromolecules*.
33. Casariego 2J, Baudo JE. Trabajo de revisión: meJanoma. *Av Periodon Implantol*. 2004; 16,3: 157-177.
34. MedlinePlus. Propranolol (Cardiovascular): MedlinePlus medicinas. Published 2017. Accessed April 4, 2021. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682607-es.html>
35. Krämer H. D, Muñoz M. P, Alfaro C. P, et al. Propranolol en el tratamiento de los hemangiomas de la infancia. *Rev Chil Pediatr*. 2010;81(6):523-530. doi:10.4067/S0370-41062010000600006
36. MedlinePlus. Ácido salicílico tópico. MedlinePlus medicinas. Published 2016. Retrived from: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a607072-es.html#:~:text=El%20%C3%A1cido%20salic%C3%ADlico%20t%C3%B3pico%20alivia,facilitar%20su%20desprendimiento%20o%20eliminaci%C3%B3n>.
37. Química.es. Ácido salicílico. Retrived from: https://www.quimica.es/enciclopedia/%C3%81cido_salic%C3%ADlico.html
38. Singh J, Sharma P, Tandon S, Sinha S. Multiple verrucous hemangiomas: A case report with new therapeutic insight. *Indian Dermatol Online J* 2017;8:254-6.

39. UMAT. Espectroscopia de infrarrojo. Published 2019. Accessed April 4, 2021. <https://www.cicy.mx/unidad-de-materiales/servicio/espectroscopia-de-infrarrojo>
40. Departamento de Química Física U de V. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. *Fundam Química Orgánica*. Published online 2011:193-207. <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf%0Awww.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>
41. Rodríguez E, Villegas E. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y Mater*. 2012;2(1):25-32. doi:10.15517/mym.v2i1.13470
42. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*. 2013;3(3). doi:10.15765/e.v3i3.420
43. Aguilar NP. Microscopia Electronica de Barrido - CIMAV Unidad Monterrey. Published 2017. Accessed April 4, 2021. <http://mty.cimav.edu.mx/sem/>
44. García A, Yusá D. *HPLC Instrumental*. Vol 5.; 2016. www.lalibreria.upv.es