USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FÍSICA

Departamento de Física de la Materia Condensada



Nanopartículas copoliméricas Inteligentes y sus aplicaciones en Biomedicina

Saira Lizette Hernández Olmos

Santiago de Compostela 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Física

Departamento de Física de la Materia Condensada

Grupo de Física de Coloides y Polímeros

Nanopartículas Copoliméricas Inteligentes y sus Aplicaciones en Biomedicina

Memoria para optar al

Grado de Doctor.

Saira Lizette Hernández Olmos

Santiago de Compostela, Julio 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Víctor Mosquera Tallón, Catedrático del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad de Santiago de Compostela, Issa Antonio Katime Amashta, Profesor Emérito de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y Eduardo Mendizábal Mijares, Profesor Titular del Departamento de Química de la Universidad de Guadalajara (México).

INFORMAN:

Que la presente memoria titulada "Nanopartículas copoliméricas Inteligentes y sus aplicaciones en Biomedicina" ha sido realizada bajo nuestra dirección por la Licenciada en Química con Maestría en Ciencias en Química Dña. Saira Lizette Hernández Olmos, en el Grupo de Investigación de "Física de Coloides y Polímeros" del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad de Santiago de Compostela, y reúne los requisitos de calidad y rigor científicos necesarios para optar al grado de Doctor.

Santiago de Compostela, Mayo de 2014

Dr. Víctor Mosquera Tallón

Dr. Issa A. Katime Amashta

Dr. Eduardo Mendizábal Mijáres

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a Dios por brindarme la oportunidad de alcanzar nuevas metas y guiarme por este camino que me ha dejado excelentes aprendizajes tanto profesionales como personales.

Agradezco a mis padres, Manuel† y Lucía por los años dedicados a mi educación. Por el amor y los cuidados. Por ser los mejores padres y por impulsarme siempre a ser mejor.

Agradezco también a Guillermo, mi futuro esposo, por la confianza, el amor, los consejos, las risas, los enojos, las comprensiones, las incomprensiones, el llanto, las diversiones, las llamadas, las madrugadas, las desveladas por skype y cada momento juntos. Pero infinitamente le agradezco por el apoyo incondicional.

Agradezco a mis hermanos (Fabiola, Liliana, Lorena, Gerardo y Francisco), a mis padrinos (Miguel Ángel y Ma. Merced) y a mis adorados sobrinos (Fernando, Samuel, Oscar, Ileana, Andrea, Luis Carlos y José Luis), por hacerme sentir su cariño y apoyo a pesar de la distancia física.

Quisiera agradecer infinitamente a mis directores de tesis, el Dr. Víctor Mosquera, el Dr. Eduardo Mendizábal Mijáres y muy en especial al Dr. Issa Katime por la ayuda brindada para la realización de este trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento a todos los componentes del Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular de la Universidad del País Vasco (UPV/UHU) por permitirme la utilización de sus instalaciones para realizar diversas pruebas de este trabajo.

Deseo agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Secretaría de Educación Pública (SEP) de México, por el apoyo económico brindado sin el cual no hubiera sido posible la culminación de este proyecto.

Agradezco también a cada una de las personas con las que compartí agradables momentos en el laboratorio. Muy en especial a mi compañero y amigo Arturo, por los momentos de apoyo moral y ánimos durante la realización de este trabajo. También muy en especial a mi querida Maitetxu (Maite Arteche).

Agradezco también a todas las personas maravillosas que he conocido en este lado del mundo y que me han dado su amistad y apoyo: Carito, Juan, Lucy, Lina, Sion, Lore, Naiara, David, Hilhui, Iñaki, Maye, Flor, Abraham y muy especialmente a mi compañera de piso y hermanita Janire.

Por último pero no menos importantes, quiero agradecer a todos mis amigos en México, los cuales me demuestran su cariño incondicional sin importar los kilómetros de distancia: Irene, Lumi, Alma, Raquel, Alejandra y la palomilla.

¡Gracias a todas las personas que han contribuido de una u otra manera en la realización de este proyecto!

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Nuestro trabajo no se pierde,

nada se pierde en este mundo,

a pesar de que las gotas de agua sean invisibles,

consiguen formar el mar

(Mikhail Bakunin)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

Página

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes 9

1.2 Objetivos 13

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Principales causantes de enfermedades a nivel mundial y datos estadísticos 19

2.2 Cáncer 20

2.2.1 Clasificación de los tipos de cáncer 22

2.2.2 Tratamientos convencionales contra el cáncer 23

2.2.3 Nuevas formas terapéuticas contra el cáncer 25

2.2.3.1 Liberación controlada de fármacos 25

2.2.3.2 Liberación vectorizada de fármacos anticancerígenos 28

2.2.3.3 Los hidrogeles poliméricos en la terapia contra el cáncer 31

2.3 Hidrogeles 32

2.3.1 Clasificación de hidrogeles 33

2.3.2 Síntesis de Hidrogeles 33

2.3.3 Factores que afectan al hinchamiento 35

2.3.4 Otras propiedades de los hidrogeles 36

2.3.4.1 Contenido de agua en el equilibrio 36

2.3.4.2 Permeabilidad 37

2.3.4.3 Biocompatibilidad 38

2.3.5 Aplicaciones 38

2.3.6 Tamaño de partícula de un hidrogel 39

2.4 Nanopartículas 40

2.4.1 Técnicas de preparación de nanopartículas 41

2.4.1.1 Técnicas por reacciones de polimerización 43

2.4.1.1.1 Polimerización en emulsión 43

2.4.1.1.2 Polimerización en microemulsión 45

2.4.1.1.3 Polimerización en nanoprecipitación 47

2.4.1.1.4 Polimerización Interfacial 49
2.4.1.1.5 Polimerización radicalaria viviente controlada 50
2.4.1.2 Técnicas por dispersión de un polímero preformado 50
2.4.1.1.7 Evaporación del disolvente 50
2.4.1.2.2 Proceso Salting-Out 51
2.4.1.2.3 Diálisis 51
2.4.1.2.4 Tecnología de fluidos súper críticos 52

Capítulo 3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y métodos 55
3.1.1 Síntesis de nanohidrogeles de Poli(N-Isopropilacrilamida-co-metacrilato de 2-dimetil amino etilo) vía polimerización en microemulsión 56
3.1.2 Síntesis de nanohidrogeles de Poli(N-Isopropilacrilamida-co-metacrilato de 2-dimetil amino etilo) vía polimerización en nanoprecipitación 61
3.1.3 Liberación de fármacos 63
3.1.3.1 Carga de fármaco en los nanogeles 64
3.1.3.2 Determinación de la cantidad de fármaco liberado 65
3.1.3.3 Cinéticas de liberación de fármacos 65
3.1.4 Estrategia de funcionalización con el ligando ácido fólico 66
3.1.4.1 Síntesis del monómero 2-Acril amidoetil carbamato (2-AAECM) 67
3.1.4.2 Incorporación del monómero 2-AAECM a las nanopartículas 69
3.1.4.3 Obtención de nanohidrogeles inteligentes funcionalizados con el ligando ácido fólico 70
3.1.5 Pruebas biológicas 73
3.1.5.1 Viabilidad celular con nanopartículas sin fármacos y con fármacos 73
3.1.5.2 Internalización de los nanogeles en las células tumorales 74

3.2 Técnicas experimentales 75
3.2.1 Difusión de luz cuasielástica (QELS) 75
3.2.1.1 Instrumentación QELS 80
3.2.1.2 Preparación de la muestra y medida 81
3.2.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier 82
3.2.5.1 Instrumentación FTIR 84
3.2.5.2 Preparación de la muestra y medida 85
3.2.3 Espectroscopia UV-Visible 86
3.2.3.1. Instrumentación UV-visible 88
3.2.3.2. Preparación de la muestra y medida 89
3.2.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) 91
3.2.4.1. Instrumentación RMN 96
3.2.4.2. Preparación de la muestra y medida 97
3.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) 97
3.2.5.1 Instrumentación DSC 102
3.2.5.2 Preparación de la muestra y medida 102

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis y caracterización de nanogeles de NIPA–co–DEA 105
4.2 Nanogeles sintetizados por microemulsión 107
4.2.1 Muestras sintetizadas 108
4.2.2 Cinética de polimerización 110
4.2.3 Caracterización mediante FTIR 112
4.2.4 Cinética de eliminación de los tensioactivos en los nanogeles mediante FTIR 115
4.2.5 Caracterización mediante RMN de protón 118
4.2.6 Caracterización térmica mediante DSC 120
4.2.7 Tamaño de partícula por microscopía TEM 122
4.2.8 Tamaño de partícula por difusión de luz (QELS) 124
4.2.9 Caracterización de la sensibilidad frente al pH 127
4.2.10 Caracterización de la sensibilidad frente a la temperatura 131
4.3 Nanogeles sintetizados por nanoprecipitación 134
4.3.1 Sistema de reacción: medio de polimerización 134
4.3.2 Muestras sintetizadas 137

4.3.3 Cinética de polimerización 139
4.3.4 Caracterización mediante FTIR 141
4.3.5 Caracterización mediante RMN de protón 142
4.3.6 Caracterización térmica mediante DSC 144
4.3.7 Tamaño de partícula por microscopía TEM 145
4.3.8 Tamaño de partícula por difusión de luz (QELS) 146
4.3.9 Caracterización de la sensibilidad frente al pH 148
4.3.10 Caracterización de la sensibilidad frente a la temperatura 149
4.4 Encapsulación y liberación de fármacos 151
4.5 5–Fluoracilo 152
4.5.1 Selección de la longitud de onda (λ) de absorción del 5–Fu y curva de calibrado 153
4.5.2 Nanopartículas sintetizadas por polimerización en Microemulsión 156
4.5.2.1 Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–Fu dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución 156
4.5.2.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–Fu dependiendo del grado de entrecruzamiento de las nanopartículas 159
4.5.2.3 Cinéticas de liberación de 5–Fu medidas por UV–Vis 161
4.5.2.4 Liberaciones de 5–Fluoracilo en función del grado de entrecruzamiento de la muestra 163
4.5.2.5 Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–FU dependiendo de la composición de alimentación de los monómeros (NIPA y DEA) 166
4.5.2.6 Liberaciones de 5–Fluoracilo dependiendo de la composición de alimentación de los monómeros (NIPA y DEA) 167
4.5.3 Nanopartículas Sintetizadas por polimerización en nanoprecipitación 168
4.5.3.1 Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–FU dependiendo de la concentración inicial

del fármaco en la solución 168
4.5.3.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–FU dependiendo del grado de entrecruzamiento de las nanopartículas 171
4.5.3.3 Cinéticas de liberación de 5–Fu medidas por UV–Vis 171
4.5.3.4 Liberaciones de 5–Fluoracilo en función del grado de entrecruzamiento de la muestra 172
4.6 Terfenadina 173
4.6.1 Selección de la longitud de onda (λ) de absorción de la terfenadina y curva de calibrado 175
4.6.2 Nanopartículas sintetizadas por polimerización en microemulsión y en nanoprecipitación 178
4.6.2.1 Determinación de la eficiencia de encapsulación de la terfenadina dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución 178
4.6.2.2 Cinéticas de liberación de terfenadina medidas por UV–Vis 181
4.7 Liberaciones con doble fármaco 182
4.7.1 5–Fluoracilo y metformina 182
4.7.1.1 Selección de la longitud de onda (λ) de absorción de la metformina y curva de calibrado 183
4.7.1.2 Nanopartículas sintetizadas por polimerización en microemulsión y en nanoprecipitación 187
4.7.1.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–Fu y de la metformina dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución 187
4.7.1.4 Cinéticas de liberación de 5–Fu y de metformina 189
4.8 Estrategia de funcionalización con el ligando ácido fólico 190
4.8.1 Incorporación del monómero 2AAECM a los nanogeles de NIPA-co-DEA 192
4.8.2 Reacción de aminólisis para la obtención del conjugado folato 193
4.8.3 Vectorización con el ligando ácido fólico 194

4.9 Pruebas biológicas 195
4.9.1 Viabilidad celular con nanogeles sin fármacos 196
4.9.2 Internalización de los nanogeles en células tumorales 197
4.9.3 Viabilidad celular con nanogeles conteniendo 5–Fu 198

Capítulo 5. CONCLUSIONES 203

Capítulo 6. BIBLIOGRAFÍA 209

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El cáncer es definido como una enfermedad neoplásica con transformación de las células, en donde las células anormales se reproducen sin control, causando un exceso de células malignas y tumoraciones.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), reportó en su informe anual, que en el año 2011 a 2012, fallecieron 1,5 millones de personas a causa de carcinomas de pulmón, tráquea y bronquios (*World Health Organization, 2013).*

Mientras tanto, en España, el Instituto Nacional de Estadística (INE), presentó el 23 de febrero de 2013, el informe sobre las causas de muerte en 2011. En ese año murieron un total de 387.911 personas. La principal causa de muerte en el país fue por enfermedades del sistema circulatorio con un 30,5% de los fallecimientos, mientras que las tumoraciones (diferentes tipos de cáncer) fueron la segunda causa, presentando un 28,2% del total de defunciones *(Instituto Nacional de Estadística, 2013)*. En este mismo informe, se reporta que el cáncer mantuvo una tendencia ascendente, con un aumento del 2% respecto al informe anterior.

Con el objetivo de enfrentar esta enfermedad y de mejorar la calidad de vida de las personas que la padecen, se están buscando diversas alternativas para su tratamiento.

En la actualidad, han emergido numerosos avances en ciencia y medicina, que han traído consigo un sinnúmero de agentes farmacéuticos altamente

específicos para el tratamiento del cáncer, incluidas algunas proteínas (anticuerpos monoclonales, hormonas, encimas y oligopéptidos sintéticos) y algunos ácidos nucleicos (ADN plasmídico, oligonucléotidos antisentido y ARN interferentes) (*Dincer et al., 2005; Couvreur et al., 2002*).

Aun cuando se ha descubierto la eficacia de diversos fármacos y macromoléculas como las mencionadas anteriormente, existen grandes obstáculos para que estos puedan ser utilizados adecuadamente en las terapéuticas actuales; tales como la falta de métodos eficaces para una administración efectiva (*Langer y Peppas, 2003).*

Hasta ahora, el método más utilizado para el tratamiento contra el cáncer, ha sido la quimioterapia. Esta consiste en la dosificación de medicamentos a través del torrente sanguíneo, encargándose de destruir a las células indiscriminadamente, sin distinguir entre células afectadas y células sanas; por lo tanto, éste es un método inespecífico que es el causante de efectos secundarios adversos en los pacientes.

Por esta razón, existe una necesidad imperiosa en el descubrimiento, mejoramiento y utilización de nuevas formas de terapéutica en la administración de fármacos para su tratamiento, ya que las convencionales (quimioterapia) no tienen la capacidad de diferenciar las células tumorales de las sanas.

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevas formas de liberación modificada (FFLM), también llamadas de liberación controlada. Se trata de dispositivos que aporten mejores pautas posológicas, mejor perfil fármaco–cinético e incluso reducción de efectos adversos. De acuerdo con la Real Farmacopea Española, las FFLM son aquellas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas son diferentes al de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía (*Lastres García, 2002*).

Recientemente, el uso de sistemas poliméricos tales como conjugados poliméricos, micelas poliméricas, policomplejos poliméricos e hidrogeles de

tamaño nanométrico están siendo estudiados con el objetivo de mejorar la eficacia de diversos fármacos, proporcionando protección contra la eliminación rápida, y la digestión enzimática, así como ser capaces de ofrecer una liberación controlada eficaz (*Langer, 1998; Duncan, 2006*).

De particular interés son los sistemas llamados "inteligentes", gracias a su capacidad de responder a las señales biológicas (estímulos externos) para la focalización específica de tejido o para la liberación controlada de fármacos. El diseño molecular de estos sistemas inteligentes debe tener en cuenta algunos factores para poder ser utilizados en la liberación de fármacos, tales como, la estabilidad, la administración, la absorción, el metabolismo y la biodisponibilidad en el sitio de destino (*Langer, 1998 y 2003; Peppas, 2004*).

Así, los denominados nanogeles de estímulo–respuesta o "inteligentes" han surgido como una nueva y prometedora clase de materiales con aplicaciones farmacéuticas. En estos sistemas, pequeños cambios en alguna variable del medio fisiológico como, por ejemplo, la temperatura, el pH o la fuerza iónica, dan lugar a una transición de fase reversible en la estructura del gel. A este respecto la poli(N–isopropilacrilamida) (PNIPA), presenta una muy bien definida temperatura de punto crítico inferior (*Lower Critical Solution Temperature* LCST) en agua cercana a 32°C, por encima de esta temperatura la estructura del gel colapsa produciéndose un brusco cambio de volumen (deshinchamiento), que resulta reversible si la temperatura del sistema vuelve a situarse por debajo de 32°C.

Por otro lado, la pH–sensibilidad de estos materiales puede conseguirse al utilizar durante la síntesis, monómeros de partida poseedores de grupos funcionales ionizables. El pH afecta a estos sistemas de manera similar a la temperatura, de forma que una determinada variación del pH del medio hace que el nanogel aumente su volumen, lo que conlleva un aumento del tamaño de los poros de la red polimérica, facilitando la migración de las moléculas que estaban en su interior hacia el exterior del nanogel. Este proceso es conocido con el nombre de

"liberación" y es el principio que rige los actuales sistemas de dosificación de drogas.

Diversas investigaciones, muestran que la mayoría de los endosomas en los que penetran los complejos folato–receptor tienen un pH que oscila entre 4,7 y 5,3; siendo el valor promedio de 5,0 *(Lee et al., 1996*). Estas diferencias en los valores de pH, que difieren del pH sanguíneo (7,4), son precisamente el punto crucial en el diseño de un sistema de liberación exclusiva para un fármaco antineoplásico en el tejido tumoral. Ya que esta exclusividad puede lograrse mediante un dispositivo de liberación controlada de fármaco que sea capaz de realizar una liberación dependiente del pH del medio externo, de forma que al pH ácido del interior de estos endosomas si se produzca la liberación del medicamento, pero que no lo haga al pH fisiológico.

Además, se puede incrementar la selectividad de las nanopartículas frente a los tumores cancerígenos (liberación dirigida), funcionalizándolas con grupos químicos que se sobreexpresen en las células tumorales, tales como la transferrina y el ácido fólico *(Byrne et al., 2008*). Estos ligandos favorecen la endocitosis de las nanopartículas en las células cancerígenas y, en consecuencia, la liberación específica en el interior de las mismas de los fármacos que transportan.

Así pues, la obtención, estudio y perfeccionamiento de la liberación de diversos fármacos a través de nanopartículas sintetizadas a partir de diversos componentes (ya sean materiales derivados del petróleo o materiales naturales como el quitosano), se ha vuelto de gran interés, ya que estos materiales son capaces de transportar al fármaco (principio activo específico) protegiéndolo de las condiciones químicas no deseadas del organismo, y después lo liberarán bajo cambios químicos definidos (principalmente el pH). Características tales como la funcionalidad potencial, la rápida respuesta frente a estímulos externos, así como su amplia área superficial, hacen de los nanogeles excelentes candidatos para su uso en diversas aplicaciones biomédicas.

1.2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo principal lograr la síntesis de nanopartículas a partir de dos monómeros, la N–isopropilacrilamida (NIPA) y el metacrilato de 2–dietilamino etilo (DEA).

Se han seleccionado estos monómeros para proporcionarle a las nanopartículas dos características principales:

1. Capacidad de respuesta a la temperatura externa (según el medio en el que se encuentren las nanopartículas).
2. Capacidad de respuesta al pH del medio externo en el que se encuentren.

La N–isopropilacrilamida será el monómero responsable de los cambios de volumen, producidos en el hidrogel cuando la temperatura exterior sea alterada. Esto gracias a la temperatura de punto crítico inferior de la NIPA, que como ya se ha comentado anteriormente en la sección 1.1, se encuentra cercana a los 32°C. Mientras tanto, el metacrilato de 2–dietilamino etilo será quien permita a las nanopartículas responder ante los estímulos de pH, ya que su valor de pK_a le permitirá a los grupos amino presentes en su estructura, protonarse y desprotonarse, experimentando también cambios de volumen.

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas se han elegido dos métodos distintos, 1) síntesis en microemulsión, que hasta ahora ha sido uno de los métodos más utilizados, gracias a las ventajas presentadas para la obtención de materiales con diámetros de partícula más pequeño que con otros métodos de polimerización por radicales libres y el segundo método 2) síntesis por nanoprecipitación, que es un método novedoso y muy prometedor para la síntesis de nanopartículas, ya que no se requiere la utilización de agentes tensioactivos para la estabilización del sistema, y esto lo convierte en un método llamado “verde” o “ecológico”.

Una vez sintetizadas y purificadas las nanopartículas, se llevará a cabo la caracterización de las mismas. Se estudiará la capacidad de respuesta de diversas muestras a los estímulos externos de pH y temperatura por medio de la técnica de difusión de luz cuasielástica (QLS). También se estudiará su morfología superficial por medio de un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Otras técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) serán utilizadas para la caracterización de estructura y propiedades básicas de las nanopartículas.

También, se estudiará por medio de la técnica de ultravioleta visible (UV–VIS) la capacidad de carga de las nanopartículas utilizando diferentes fármacos anticancerígenos (o fármacos que por lo menos se haya demostrado su eficacia en la destrucción de células tumorales), tales como el 5–fluoracilo, la metformina y la terfenadina. Así mismo, se evaluará también la capacidad de liberación de las nanopartículas para cada uno de los fármacos ya mencionados.

Otra técnica será, analizar la capacidad de liberación, integrando dos fármacos (por ejemplo, 5–fluoracilo y metformina) en la misma red polimérica, intentando mejorar la efectividad de nuestras muestras y reducir o eliminar al máximo la cantidad de células tumorales posibles.

El siguiente paso será incorporar a la matriz polimérica una molécula directora (ácido fólico), con el objetivo de que ésta interactúe con las células cancerígenas por medio de un mecanismo de endocitosis medida por receptor. El ácido fólico se incorporará a las nanopartículas por medio del método denominado EDC, que consiste en la activación previa del ácido fólico, permitiéndole así, unirse covalentemente al esqueleto de la red polimérica.

Por último, se realizarán algunas pruebas biológicas para demostrar la posible aplicación de nuestras nanopartículas en el tratamiento contra el cáncer. Primeramente se realizarán las pruebas de viabilidad en algunas células tumorales, para comprobar que las nanopartículas por sí solas (sin contener ningún fármaco

en su estructura) pudieran ser tóxicas y causar la muerte de otro tipo de células (células sanas). Después se estudiará la internalización de las nanopartículas hacia las células cancerígenas y por último, se estudiará su efectividad induciendo apoptosis (muerte celular) en células con diferentes tipos de carcinomas (melanoma, cáncer de pecho, neuroblastoma y cáncer de colon).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Principales enfermedades causantes de muerte a nivel mundial y datos estadísticos.

La mortalidad es la unidad de muerte, la cual puede expresarse ya sea como el número de muertes ocurridas por la enfermedad o también puede expresarse como tasa de mortalidad, por ejemplo, el número de muertes por cada 100.000 personas al año.

Los datos de mortalidad se encuentran comúnmente disponibles en las bases de datos nacionales de estadística, agrupados en diferentes grupos tales como muertes por año, muertes por grupos de edad (normalmente cada 5 años) y por último, grupos por sexo.

También existe una base de datos que se extiende a nivel mundial; esta es la base de datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO), en la cual, se encuentran registros para causas específicas de mortandad para 70 países, recabando datos desde la década de los cincuenta, también es posible encontrar tablas y figuras (*Hjartåker et al., 2008*). Dentro de esta base, también se encuentran tablas específicas por enfermedades, como por ejemplo la Agencia Internacional para Estudio del Cáncer (*IARC, International Agency for Research of Cancer).*

Tanto en las bases de datos nacionales como en la de la WHO, así como en las bases de la comisión Europea, se han identificado las enfermedades causantes de un mayor número de muertes, también llamadas enfermedades crónicas.

Una enfermedad crónica y/o de alta prevalencia, está definida, como aquella enfermedad que afecta al menos a 50 de cada 100.000 personas. Entre éstas enfermedades figuran:

- Enfermedades cardiovasculares
- Cáncer
- Problemas de salud mental
- Diabetes mellitus
- Enfermedad crónica respiratoria y
- Afecciones musculoesqueléticas

Según el boletín de salud pública de la comisión europea, dichas enfermedades en conjunto, son las responsables del 87% del total de las muertes en la Unión Europea, siendo el cáncer una de las enfermedades con mayor índice de mortandad (*European Commission, 2013*).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud, reportó en su informe anual, que en el año 2011–2012, fallecieron 1,5 millones de personas a causa de carcinomas de pulmón, tráquea y bronquios (*World Health Organization*, 2013).

2.2. Cáncer.

Como se ha mencionado en la sección 2.1, el cáncer está catalogado, como una de las enfermedades crónicas y/o de alta prevalencia, causantes de un gran índice de muertes no sólo en la Unión Europea (*European Commission*, 2013), sino también en todo el mundo según la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, 2013).

La palabra cáncer se deriva de la palabra griega "*karkinos"*, que significa "cangrejo". Se dice que Hipócrates fue quien le dio este nombre, (considerado por algunos autores como el padre de la medicina, (*Grammaticos y Diamantis, 2008*)

al darse cuenta que algunas formas de cáncer avanzado adoptan una forma abigarrada (varios elementos amontonados y heterogéneos), con ramificaciones adheridas con obstinación a todo lo que agarran, y pensó que esta forma era muy similar a la de un cangrejo marino, y de ahí viene la derivación de su nombre (*Calvo et al., 1997).*

La palabra neoplasia se aplica generalmente a los tumores malignos, los cuales son proliferaciones de células con comportamiento anormal; aunque puede emplearse de una manera genérica la palabra "tumor". Por lo general se dice que hay tumores benignos y tumores malignos.

Todos los tumores, benignos y malignos, tienen dos componentes básicos en su estructura:

1. Las células neoplásicas proliferantes
2. Su estructura de sostén, constituido por tejido conectivo y vasos sanguíneos.

Tumores benignos. Su nombre acaba en el sufijo –oma*;* simplemente, y según el origen del tejido del que proceden los tumores benignos pueden ser: fibroma (tejido conjuntivo fibroso), mixoma (tejido conjuntivo laxo), lipoma (tejido adiposo), condroma (tejido cartilaginoso), osteoma (tejido óseo), hemangioma (vasos sanguíneos), linfangioma (vasos linfáticos), meningioma (meninges), tumor glómico (tejido nervioso de sostén), leiomioma (tejido muscular liso), rabdomioma (tejido muscular estriado), papiloma (tejido epitelial formando papilas), adenoma (tejido glandular), teratoma (células totipotenciales), nevus (melanocitos).

Algunos de los tumores benignos derivados de tejido epitelial terminan con el sufijo "adenoma" porque el tejido epitelial de origen forma glándulas, si bien tenemos que tener en cuenta que existen múltiples excepciones a las normas de nomenclatura tumoral. Por ejemplo: el tumor benigno de melanocitos se denomina Nevus o nevo, y su forma maligna, Melanoma.

Tumores malignos o cáncer. Los cánceres que derivan de los tejidos mensenquimatosos o mesodermo se denominan sarcomas (del griego *sarcos*, "carnoso"); por ejemplo: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma,

condrosarcoma, osteosarcoma, angiosarcoma, lifangiosarcoma, sinoviosarcoma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma.

Por otro lado, cabe destacar que la característica que hace mortales a los cánceres malignos, comparativamente con los benignos (no mortales), es la mencionada capacidad de invasión de tejidos, en donde las células tumorales, generalmente cuando se alojan en el parénquima de un órgano, destruyen la arquitectura del mismo, siendo, a su vez, sus residuos metabólicos tóxicos para las células sanas adyacentes, causando la eliminación de este tipo celular. Una capacidad interesante propia de las células cancerosas invasivas es la producción de vasos sanguíneos (angiogénesis) para nutrirse, los cuales son los responsables de la densa red vascular que poseen los tumores (*Mu y Feng*, 2003). Esta característica le permite al parénquima tumoral tener un gran aporte de oxígeno y nutrientes, lo cual favorecerá su crecimiento y proliferación a mayor velocidad y distancia.

2.2.1 Clasificación de los tipos de cáncer.

Los diferentes tipos de cáncer se pueden clasificar por el sitio donde se origina o por la histología del tejido afectado.

Clasificación por el sitio de origen. Dependiendo del sitio de origen primario, los cánceres pueden ser de tipos específicos, como por ejemplo: cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer del riñón, cáncer oral, cáncer de cerebro etcétera.

Clasificación por los tipos de tejido. Dependiendo del tipo de tejido afectado, podemos clasificar al cáncer en seis diferentes tipos (ICD–O–3, 2013):

1. Carcinoma: Es aquel tipo de cáncer que se desarrolla en las células de tejido epitelial o glandular. Los cánceres más comunes de este tipo son el de piel, boca, pulmón, mama, tracto digestivo y útero.

2. Sarcoma: es aquel tipo de cáncer que se desarrolla en algún tejido conjuntivo. Como por ejemplo, hueso, cartílago, grasa, músculos y vasos sanguíneos.
3. Mieloma: Es el tipo de cáncer que se origina en las células de plasma de la médula. Las células de Plasma son capaces de producir los diversos anticuerpos en respuesta a infecciones. El Mieloma es un tipo de cáncer de sangre.
4. Leucemia: se agrupa dentro de los cánceres de sangre; consiste en la proliferación incontrolada de una población anómala de células de la sangre. Estas células anómalas infiltran la médula ósea, impidiendo la producción de las restantes células normales, e invaden la sangre y otros órganos.
5. Linfoma: son un tipo de cáncer que afecta a los linfocitos (células que forman parte de nuestro sistema inmune). Pese a que otros tipos de cáncer como el cáncer de pulmón, mama o colon pueden afectar en su extensión a los ganglios linfáticos, la característica de los linfomas es que se originan en ellos.

2.2.2 Tratamientos convencionales contra el cáncer.

Los tratamientos contra el cáncer se fundamenten en tres pilares: cirugía, quimioterapia y radioterapia.

El tratamiento del cáncer es multidisciplinar, donde la cooperación entre los distintos profesionales que intervienen, es de máxima importancia para la planificación del mismo. Dada la incapacidad actual de la medicina para curar los tipos de cáncer más agresivos en estados avanzados de evolución, es preferible el empleo de vehículos transportadores que resultan menos agresivos durante el tratamiento. La respuesta al tratamiento con vehículos activos puede ser:

a) Completa: Si se ha producido la desaparición de todos los signos y síntomas de la enfermedad.

b) Parcial: Si existe una disminución mayor del 50% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones mensurables.
c) Objetiva: Es la respuesta completa o parcial.
d) Progresión: Si aparece cualquier lesión nueva o existe un aumento mayor del 25% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones mensurables.
e) Estable: Si existe crecimiento o reducción del tumor que no cumple ninguno de los criterios anteriores.

El término quimioterapia suele reservarse a los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos se denominan medicamento citotástico, citostáticos o citotóxicos. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se administre. La quimioterapia no suele ser el único tratamiento del cáncer, por lo que se suele combinar con cirugía y radioterapia, modalidad que se llama tratamiento combinado o multidisciplinar.

En la actualidad existen más de 100 fármacos antineoplásicos que se suelen usar en combinación:

a) Agentes alquilantes: su mecanismo de acción general, es el daño inducido al ADN celular (tanto neoplásico como sano) al incorporar grupos alquilo, y de esta manera alterar o evitar la duplicación celular.
b) Antimetabolitos: Sustancias análogas o componentes naturales:
    - Análogo del ácido fólico: metotrexato.
    - Análogo de la purina: 6–mercaptopurina
    - Análogos de la pirimidina: 5–fluoracilo, ara–c.
c) Alcaloides de la vinca
d) Antibióticos antitumorales

e) *Cis*–platino y derivados

La inmunoterapia del cáncer intenta estimular el sistema inmunológico para rechazar y destruir tumores. La inmunoterapia con BCG para la primera fase (no invasiva) del cáncer de vejiga utiliza la instilación de bacterias vivas atenuadas en la vejiga, y es eficaz en evitar la reaparición en hasta dos tercios de los casos.

El principal problema de estos fármacos es su elevada toxicidad debido a la incapacidad para diferenciar las células tumorales de las células sanas. Es muy frecuente administrar dos o tres citostáticos juntos. Estas asociaciones tienen la ventaja de que se puede reducir la resistencia de las células tumorales a los citostáticos y se puede ampliar la potencia al emplear fármacos con diferente mecanismo de acción. El inconveniente es que se pueden sumar los efectos tóxicos. Para evitarlo se procura asociar citostáticos con distinta toxicidad.

La mayoría se administran por vía intravenosa y debido a que son muy tóxicos es necesario ajustar la dosis con la mayor precisión posible. Se ajusta por la superficie corporal que deriva del peso y talla. Se administran normalmente en ciclos con períodos de descanso. Con estos periodos de descanso se intenta que las células normales, por ejemplo las de la medula ósea, se recuperen del efecto tóxico del citostático mientras que las tumorales se recuperan en menor cuantía. De esta forma y repitiendo los ciclos se pretende reducir progresivamente el número de células tumorales hasta conseguir su erradicación completamente, mientras que las células normales se mantienen al recuperarse después de cada ciclo.

2.2.3 Nuevas formas terapéuticas contra el cáncer.

2.2.3.1 Liberación controlada de fármacos.

La tecnología de la liberación controlada de fármacos surgió durante la década de los ochenta como una alternativa a los sistemas de liberación

tradicionales para conseguir una respuesta óptima del fármaco, con efectos secundarios mínimos y una eficiencia prolongada en el organismo.

Dentro de la liberación controlada de fármacos, la terapia anticáncer es un área ampliamente estudiada. En los últimos años se han hecho grandes avances para que las nuevas terapéuticas sigan el camino de la liberación específica, mediante la utilización de moléculas receptoras frente a antígenos antitumorales y mediante la liberación selectiva del fármaco en la célula cancerígena.

Los geles poliméricos son candidatos idóneos como soportes para realizar una liberación controlada de fármacos, de forma específica en la zona deseada, dada su diversidad y facilidad de modificación y funcionalización.

Para que un gel polimérico actúe como soporte en liberación controlada es necesario, en primer lugar, la incorporación de la sustancio biológicamente activa dentro del gel, que puede llevarse a cabo de forma física o química. En la incorporación por métodos físicos se puede considerar que el fármaco se encuentra embebido en la matriz que actúa como soporte de almacenamiento y dosificación. En la incorporación química el principio farmacológicamente activo está unido químicamente a la macromolécula, generalmente mediante enlaces tipo éster, anhídrido o amida.

Como ocurre en los mecanismos de incorporación de fármaco, entre los mecanismos de liberación también se puede distinguir entre mecanismos físicos, principalmente difusión e hinchamiento, y químicos, que normalmente suelen estar basados en sistemas biodegradables.

La liberación controlada por hinchamiento, por su sencillez y versatilidad, ha sido la más ampliamente estudiada en las últimas décadas. En este tipo de mecanismo de liberación las matrices poliméricas al ponerse en contacto con los fluidos biológicos absorben el agua, aumentando su tamaño tridimensional, hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento sin disolverse (figura 2.1). Por un lado, el soporte polimérico absorbe el agua del medio aumentando su volumen, y por otro, simultáneamente se da una desorción del compuesto bioactivo albergado en el

interior del soporte por un mecanismo de difusión controlado por el hinchamiento que sufre el polímero (*Korsmeyer* y *Peppas*, 1991).

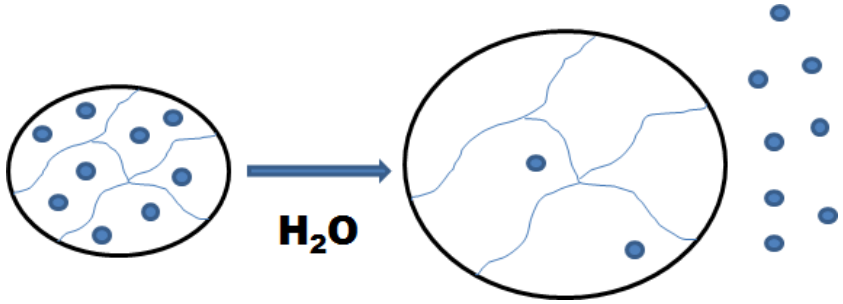


Figura 2.1. Esquema del mecanismo de liberación del fármaco desde una matriz polimérica por hinchamiento a partir del gel polimérico en estado colapsado cargado con el fármaco.

Algunos sistemas poliméricos entrecruzados, además pueden activar o modificar su hinchamiento en forma reversible ante un cambio en el ambiente que rodea al sistema de liberación, como pueden ser cambios en el pH, temperatura o fuerza iónica. De esta forma, un gel capaz de responder a estímulos externos cargado con principio activo, ante una determinada variación del medio varía su interacción con éste, favoreciendo su incorporación al interior de la red polimérica, de forma que se puede hinchar y tener lugar la salida a través del transporte difusional del fármaco cargado en su interior como se puede observar en la figura 2.2.

Muchos compuestos han sido utilizados como sistemas transportadores de principios activos para una liberación controlada, como, polímeros naturales o sintéticos, lípidos, tensioactivos y dendrímeros (*Duncan*, 2003; *Sampathkumar* y *Yarema*, 2005).

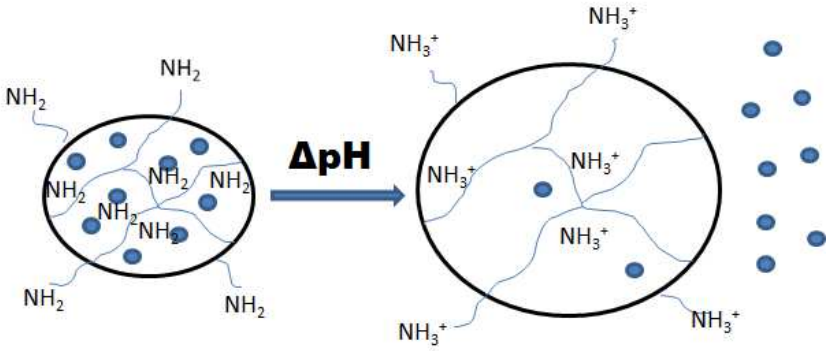


Figura 2.2. Sistema de liberación por hinchamiento activado por sensibilidad al pH.

2.2.3.2 Liberación vectorizada de fármacos anticancerígenos.

Una forma de conseguir que los fármacos anticancerígenos ejerzan su acción sólo en las células tumorales es la vectorización de un soporte que transporte los principios activos, de tal forma que el transportador sea capaz de diferenciar las células enfermas de las sanas.

Se sabe que las células cancerosas a menudo sobre–expresan algunos antígenos específicos o receptores en sus superficies, que pueden ser utilizados como dianas en la nanomedicina moderna. En este sentido, en los últimos años, se estudia la posibilidad de sintetizar geles poliméricos que alberguen fármacos antitumorales en su interior, de tamaño nanométrico para viajar a lo largo del torrente sanguíneo, y químicamente modificados con moléculas directoras que les permitan reconocer e interactuar específicamente con los receptores en los tejidos tumorales (*Byrne et al.*, 2008; *Kim et al.*, 2007). Estos sistemas compuestos por la molécula directora, fármaco y el soporte polimérico resultan ser muy interesantes por las siguientes razones:

- Los fármacos físicamente atrapados mantienen su actividad,
- Se pueden cargar en los núcleos de los transportadores una carga útil, relativamente alta de fármacos, y en el caso de fármacos no solubles puede ser superior a su solubilidad intrínseca en agua,

- Las moléculas directoras presentes en la superficie de los conductores aumentan la probabilidad de enlace a las células diana.

El ácido fólico (figura 2.3), una vitamina de bajo peso molecular (441 g·mol^{-1}), tiene gran afinidad con los receptores folato (FRs), que frecuentemente están sobreexpresados en las células de algunos tipos de cáncer humanos, en particular las que se encuentran en los tumores epiteliales de diferentes órganos como son el colon, próstata, ovarios y pulmón.

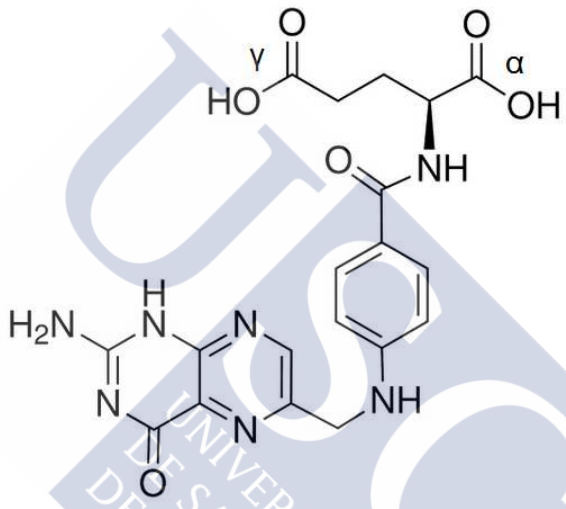


Figura 2.3. Estructura molecular de una molécula de ácido fólico.

El ácido fólico, además de la elevada especificidad hacia el tejido tumoral, ofrece potenciales ventajas, entre las que se incluyen su pequeño tamaño, que conlleva favorables propiedades farmacocinéticas, una reducida inmunogenicidad que permite una administración repetida, gran disponibilidad e inocuidad (*Sudimack y Lee*, 2000). Todo ello, unido a su relativamente sencilla conjugación química, ha hecho de él una interesante y prometedora molécula en las terapias específicas antitumorales (*Reddy y Low*, 1998).

Existen diferentes métodos para vectorizar moléculas con ácido fólico. La vía de ataque covalente más sencilla para este ligando son sus grupos carboxílicos

tanto α como γ. Sin embargo, se ha demostrado que los receptores folato de las células tumorales tienen mayor especificidad por el α–carboxilo que por el γ–carboxilo del ácido fólico (*Leamon et al.*, 1993; *Wang et al.*, 1997). Por lo que en principio, parece más conveniente la unión del ácido fólico a la molécula sustrato conjugada a través del γ–carboxilo para mantener así libre el α–carboxilo, y asegurar la vectorización hacia las células cancerígenas. De hecho, el γ –carboxilo es el punto de unión estéricamente más favorecido de la molécula de ácido fólico, por lo que la reacción de vectorización mayoritariamente se da en este grupo, asegurándose así una suficiente proporción en el sistema conjugado folato final de α–carboxilo libre y altamente reconocible por los receptores folato de las membranas tumorales (*Leamon y Low*, *1991 y 1992*).

Estos sistemas conjugados de ácido fólico son interiorizados en las células tumorales de un modo no destructivo a través de un proceso de endocitosis (figura 2.4). La endocitosis es el proceso por el que la célula capta partículas del medio externo mediante una invaginación de la membrana en la que se engloba la partícula a ingerir. Se produce la estrangulación de la invaginación originándose una vesícula que encierra el material ingerido (*Leamon y Low*, 1992 y 1993). Cuando los complejos receptor–ácido fólico se encuentran en estas vesículas, el contenido de éstas se acidifica por la secreción de protones debida a un proceso conocido como acidificación endosómica (*Leamon y Low*, 1993; *Lu y Low*, 2002), y las moléculas de ácido fólico se disocian de los receptores y alcanzan el citoplasma para su almacenamiento o su utilización metabólica (*Anthony*, 1992).

Para caracterizar el cambio de pH que estos conjugados folato sufren al pasar al medio intracelular, diferentes estudios han medido indirectamente el valor de pH de endosomas individuales que contenían conjugados folato y han encontrado que aunque este valor puede variar considerablemente (4,7–5,3), el valor promedio resultó ser de pH ≈ 5,0 (*Lee et al., 1996*). Dicho pH es claramente diferente al pH fisiológico del torrente sanguíneo y de cualquier tejido sano (pH = 7,4). Esta variación de pH puede ser clave en el desarrollo de nuevos

transportadores de antineoplásicos pH–sensibles que lleven a cabo una liberación del medicamento de forma exclusiva en las células dañadas.

En los últimos años, siguiendo la estrategia de vectorización con ácido fólico, se han sintetizado diferentes sistemas conjugados transportadores de fármacos antineoplásicos como liposomas, oligonucléotidos, copolímeros de bloque o nanogeles (*Oyewumi et al.*, 2004; *Poon et al.*, 2011; *Sudimack y Lee*, 2000; *Shen et al.*, 2011).

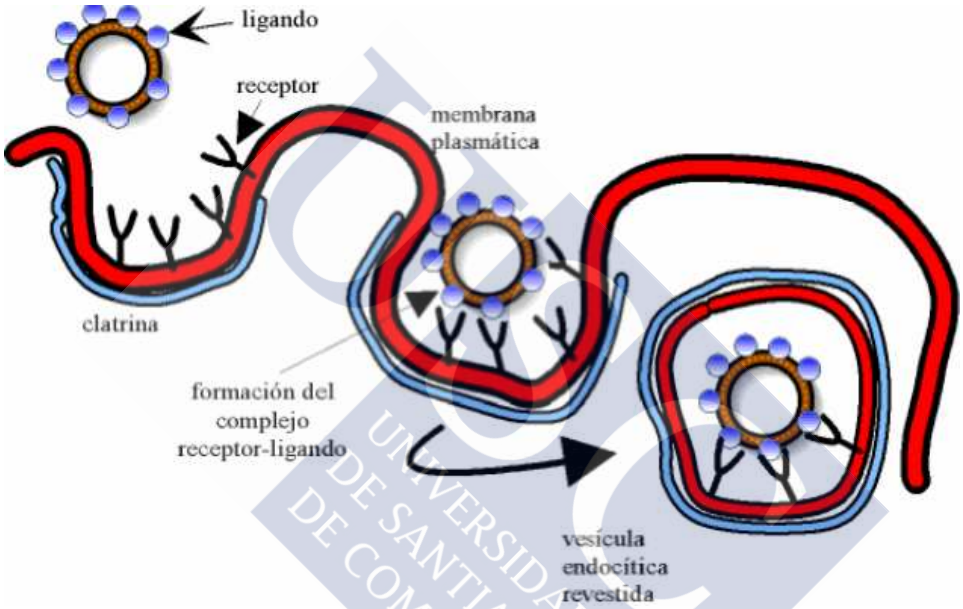


Figura 2.4. Esquema del mecanismo de incorporación de los conjugados folato mediante endocitosis medida por receptor.

2.2.3.3 Los hidrogeles poliméricos en la terapia contra el cáncer.

Los hidrogeles son materiales poliméricos que comúnmente presentan cambios de volumen en respuesta a cambios en las condiciones externas. La red polimérica puede cambiar su volumen en respuesta a un cambio en el medio como la temperatura, el pH, la composición del disolvente, los estímulos eléctricos, la acción de campos eléctricos etc.

Una característica particular de la mayoría de las investigaciones de la última década, se centra en los efectos producidos en las redes poliméricas debidos a las variaciones del pH y la temperatura, ya que estas variables son cruciales en sistemas fisiológicos, biológicos y químicos.

Como ha sido descrito anteriormente, tiene lugar un cambio de pH significativo entre el pH fisiológico (7,4) sano y el del interior de los endosomas en los que penetran los soportes poliméricos (hidrogeles) funcionalizados con ácido fólico en las células tumorales (5,5). Por este motivo, sistemas poliméricos que presenten grupos ionizables con valores de pK_a próximo por debajo del pH fisiológico, pueden ser potencialmente interesantes para llevar a cabo una liberación selectiva en las células cancerígenas.

2.3 Hidrogeles.

Los hidrogeles son materiales poliméricos que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos, y que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse (*Wichterle, 1971; Ratner y Hoffman*, 1976; *Pedley*, 1980). En estado deshidratado, se donominan xerogeles, y estos materiales pueden llegar a ser cristalinos (*Lee*, 1985).

Las características principales que definen a un hidrogel son consecuencia de diversos factores:

1. Su carácter hidrofílico es debido a la presencia de grupos solubles en el agua como: – OH, – $CONH_2$, – CONH, – SO_3H (*Moreno*, 2003).
2. La insolubilidad es originada por la existencia de una malla o red tridimensional en su estructura.
3. Su tacto suave y consistencia elástica se encuentra determinada por el monómero o monómeros hidrófilos de partida y por la baja densidad de entrecruzamiento del polímero.

4. Se hinchan en agua aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico, pero sin perder su forma. El estado hinchado es el resultado del balance entre las fuerzas dispersivas y cohesivas intermoleculares que actúan en la cadenas hidratadas (*Andrade*, 1976).

2.3.1 Clasificación de hidrogeles.

Los hidrogeles pueden clasificarse de varias formas dependiendo de qué características y propiedades particulares se tomen como referencia (*Peppas et al.*, 2000).

En base a la naturaleza de los grupos laterales pueden clasificarse en neutros o iónicos (aniónicos, catiónicos, anfolíticos). Dependiendo del método de preparación: red homopolimérica, copolimérica, multipolimérica, o red polimérica interpenetrada (*Peppas et al.*, 2000; *Bell y Peppas*, 1995). Finalmente, pueden clasificarse en base a la estructura física de la red en hidrogeles como amorfos o semicristalinos (*Peppas y Mikos*, 1986; *Hickey y Peppas*, 1995).

Los hidrogeles también pueden presentar un comportamiento de hinchamiento dependiente del medio externo, se dice entonces que son hidrogeles fisiológicamente sensibles (*Peppas*, 1991). Algunos de los factores que afectan al hinchamiento de este tipo de hidrogeles incluyen a: el pH, la fuerza iónica y la temperatura.

2.3.2 Síntesis de hidrogeles.

Para llevar a cabo la síntesis de un hidrogel, se necesitan los elementos habituales para realizar cualquier reacción de polimerización en solución, tales como el disolvente, el o los monómeros y el iniciador, pero debe agregarse un

agente entrecruzante que será el responsable de la estructura reticulada del gel (*Ratner y Hoffman*, 1976).

Al sintetizar un hidrogel se puede elegir entre un gran número y tipo de monómeros, entre los que podemos mencionar los siguientes:

1. Monómeros con sustituyentes laterales no ionizables. Por ejemplo, N–vinil pirrolidona, metacrilato de 2–hidroxietilo, N–metilacrilamida.
2. Monómeros con grupos funcionales ionizables. Por ejemplo, ácido acrílico, acrilamida, ácido metacrílico, ácido itacónico, 2–vinil piridina, 4–vinil piridina, vinil amina. Los hidrogeles preparados a partir de estos monómeros captan gran cantidad de agua.
3. Monómeros *zwiteriónicos*, tal como (N – (3 – sulfopropil) – N – metacroiloxi etileno). Las cadenas poliméricas que se obtienen al polimerizar estos monómeros tienen sustituyentes laterales que contienen dos grupos con carga diferente, esta característica permite al hidrogel tener un hinchamiento mayor en soluciones salinas que en medio acuoso.

Existen varios métodos de preparar hidrogeles entrecruzados como son:

1. Entrecruzamiento por radiación: esta reacción utiliza la emisión de electrones, rayos gamma, rayos X o luz ultravioleta para excitar el polímero y producir la estructura entrecruzada.
2. Reacción química: este método es una reacción de copolimerización y entrecruzamiento entre uno o más monómeros y un monómero multifuncional el cual está presente en muy pequeñas cantidades, este último se denomina agente entrecruzante.

En la síntesis de hidrogeles, la práctica más común consiste en copolimerizar distintos monómeros para obtener propiedades finales adecuadas a la aplicación deseada. Por lo general, a un monómero hidrófilo (que asegurará una mayor entrada de agua en la red molecular y por lo tanto, un mayor contenido de agua) se le añade uno hidrófobo (que mejora sensiblemente las propiedades

mecánicas del hidrogel resultante) (*Nagaoka*, 1989). Por otro lado, se pueden obtener diferentes tipos de hidrogeles variando la estructura molecular o el grado de entrecruzamiento del material (*Wood et al.*, 1982). Independientemente del tipo de polimerización, y de los monómeros que se utilicen, es necesario emplear un iniciador que desencadene la reacción. Los sistemas de iniciación que pueden emplearse, son los comunes en la síntesis de polímeros: radicales libres, temperatura, iniciadores iónicos, radiación gama o par redox.

En general, el grado de entrecruzamiento determina la solubilidad, el grado de hinchamiento, el tamaño de poro del material, el área total superficial y la resistencia mecánica del hidrogel (*Akelah y Moet*, 1990). La elección del agente entrecruzante y de otros monómeros modificadores de propiedades, depende del tipo de monómero base elegido y es fundamental a la hora de optimizar las propiedades del hidrogel a sintetizar. Por lo tanto, la elección del agente entrecruzante es fundamental para optimizar las propiedades, estos compuestos tienen varios grupos reactivos en su estructura, siendo frecuente la utilización de compuestos tetrafuncionales y hexafuncionales.

2.3.3 Factores que afectan al hinchamiento.

El grado de entrecruzamiento es uno de los factores más importantes que afectan al hinchamiento de los hidrogeles. Los hidrogeles muy entrecruzados tienen una estructura más compacta y se hinchan mucho menos comparándolos con el mismo hidrogel con un entrecruzamiento menor. Existen redes poliméricas tridimensionales que pueden absorber una gran cantidad de agua. Durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red asumen una configuración alargada y esta dilatación va acompañada de la aparición de una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, que actúa como una presión que las cadenas de la malla ejercen sobre el disolvente contenido en ella. A medida que la malla se hincha con el disolvente, aumenta dicha presión elástica y el hinchamiento alcanza

su valor máximo o de equilibrio cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas (*Karlsson y Gatenholm*, 1999).

La estructura molecular del polímero también puede afectar al hinchamiento. Aquellos hidrogeles que contienen grupos hidrófilos en su estructura se hinchan en mayor grado que aquellos que contienen grupos hidrófobos, los cuales se colapsan en presencia de agua, minimizando su interacción con las moléculas de agua y dando como resultado hidrogeles mucho menos hinchados (*Karlsson y Gatenholm*, 1999).

2.3.4 Otras propiedades de hidrogeles.

Las propiedades de los hidrogeles cuando alcanzan el estado de hinchamiento en equilibrio son las siguientes:

2.3.4.1 *Contenido de agua en el equilibrio.*

El contenido de agua en equilibrio de un hidrogel es una propiedad básica muy importante, dado que controla propiedades como la permeabilidad, propiedades mecánicas, propiedades superficiales y de biocompatibilidad. Varias aplicaciones útiles requieren una apropiada cantidad de agua. Los hidrogeles con alto contenido de agua son generalmente más ventajosos porque muestran una mayor permeabilidad y biocompatibilidad. Sin embargo, al aumentar el contenido de agua, la resistencia mecánica del hidrogel disminuye y la transparencia del gel puede reducirse como consecuencia de una separación de fase microscópica entre el agua y el polímero. Para sintetizar un hidrogel con alta resistencia mecánica, alta transparencia y alto contenido de agua, es necesaria una estructura molecular mixta. Esta estructura puede consistir en un componente hidrofílico que absorbe grandes cantidades de agua y un componente hidrófobo que mejore la resistencia mecánica (*Nagaoka*, 1989).

El contenido de agua del hidrogel hinchado (W) se puede expresar como:

$$W = \frac{m - m_0}{m} \qquad (2.1)$$

donde m y m_0 son los pesos del hidrogel y del xerogel, respectivamente.

Para dar un valor porcentual del contenido de agua en peso, la ecuación (2.1) se multiplica por 100. El grado de hinchamiento (D_h) se expresa como:

$$D_h = \frac{m}{m_0} \qquad (2.2)$$

donde $D_h \geq 1$.

En función del volumen, el grado de hinchamiento se multiplica por la densidad del hidrogel y se divide entre la densidad del xerogel, como se expresa a continuación:

$$R_h = \frac{m \cdot \rho}{m_0 \cdot \rho_0} = D_h \frac{\rho}{p_0} \qquad (2.3)$$

donde ρ es la densidad del hidrogel y ρ_0 es la del xerogel.

2.3.4.2. *Permeabilidad.*

La velocidad de transporte de compuestos de bajo peso molecular a través de hidrogeles es un importante parámetro para muchas aplicaciones. Así por ejemplo, la permeabilidad al oxígeno es de fundamental importancia en aplicaciones de lentes de contacto. Por otra parte, se ha observado que el transporte de iones a través de la membrana no solamente depende de su tamaño, sino del contenido de agua que es el factor que condiciona el tamaño del poro. Teniendo en cuenta que el contenido de agua depende de la estructura molecular, pueden diseñarse

membranas de diferente tamaño de poro, y que por lo tanto, permitan el paso selectivo de diferentes iones (*Tighe*, 1986).

2.3.4.3 *Biocompatibilidad.*

En el campo de los polímeros, el término biocompatibilidad se refiere a dos aspectos diferentes pero que se encuentran directamente relacionados:

- La elevada tolerancia que han de mostrar los tejidos ante ese agente extraño, fundamentalmente cuando el polímero va a ser implantado.
- La estabilidad química y, especialmente, física del material polimérico durante todo el tiempo en el que se encuentre en contacto con el organismo.

2.3.5. Aplicaciones.

Desde el inicio de la síntesis de los hidrogeles en la década de los 60's del siglo pasado (*Wichterle y Lím*, 1960), se han encontrado para estos materiales una gran cantidad de aplicaciones de suma importancia para el desarrollo científico y tecnológico. Algunas de las aplicaciones más importantes son: lentes de contacto (*Franklin et al.*, 1993), superficies hemocompatibles (*Cohn et al.*, 1992), sistemas de liberación controlada de principios activos (*Schott*, 1992; *Welz y Ofner*, 1992), sensores de glucosa, aditamentos para la agricultura y para uso en productos de higiene personal, entre otros. En años recientes ha incrementado el estudio de una nueva aplicación para los hidrogeles, la cual consiste en utilizarlos como sistemas transportadores y liberadores de fármacos para aplicaciones biológicas. Una de las ventajas de los hidrogeles en la liberación de fármacos, es su capacidad de hinchamiento, ya que esto permite la entrada de la solución que contiene los fármacos disueltos.

2.3.6 Tamaño de partícula de un hidrogel.

Carothers fue el primero en definir la gelación como el resultado de un proceso de unión de las moléculas de polímero originando una red tridimensional de tamaño infinitamente grande (*Carothers*, 1931). El término "infinitamente grande", de acuerdo con *Flory*, se refiere a una molécula de dimensiones del orden de la magitud a las del recipiente que la contiene (*Flory*, 1941). Por lo tanto, cada una de estas moléculas tiene en realidad un tamaño finito, el del recipiente, pero en comparación con las moléculas ordinarias, éste resulta ser infinitamente grande (*Flory*, 1941). De lo que se deduce que para conseguir geles de tamaño pequeño, el método de síntesis deberá consistir en disminuir el tamaño del "recipiente", es decir, el volumen de polimerización.

Por lo tanto, un hidrogel puede obtenerse de diferentes tamaños de partícula, dependiendo del método de síntesis que se seleccione. Podemos encontrar macrogeles, microgeles e hidrogeles de tamaño nanométrico.

En la figura 2.5 se muestra una imagen de los diferentes tipos de hidrogeles que pueden obtenerse, dependiendo del diámetro de la partícula obtenida.

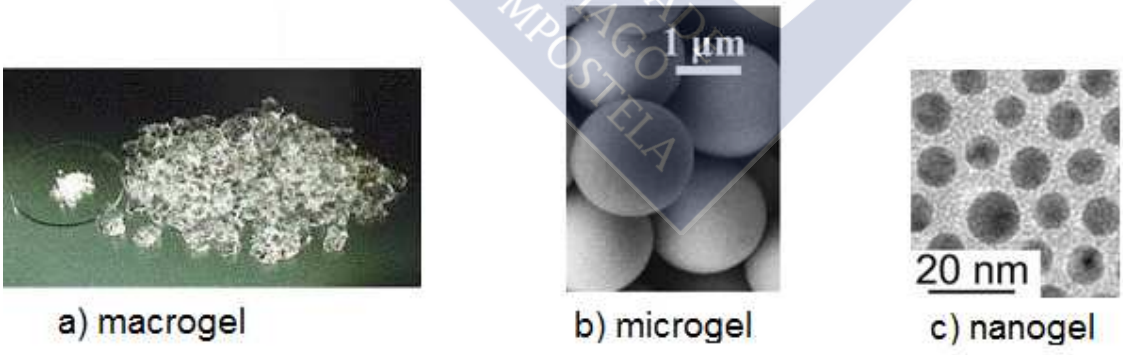


Figura 2.5. Distintos diámetros de partícula de los hidrogeles a) macro b) micro, y c) nano

Para que un hidrogel pueda ser utilizado vía intravenosa como transportador de fármacos anticancerígenos, será necesario reducir el diámetro de partícula a la

escala de los nanómetros, para así evitar efectos secundarios indeseables como trombosis.

2.4 Nanopartículas.

Durante las últimas décadas, el campo de las nanopartículas (PNP) se ha expandido con mucha rapidez, jugando un rol muy importante en amplias áreas de estudio como por ejemplo desde el área electrónica, materiales conductores, medicina y biología, tecnología de control de contaminación ambiental (*Schmid, 2004; Wang et al., 2004; Brahim et al., 2001; Zhang y Chuang, 2001*).

Las nanopartículas son frecuentemente definidas como partículas sólidas y coloidales que se encuentran en el intervalo de diámetro de entre 10-1000 nm (*Kreuter, 1994; Couvreur, 1988*). El término polinanopartícula (PNP) es un término colectivo dado para cualquier tipo de nanopartícula polimérica, que pueden clasificase en dos: nanoesferas y nanocapsulas, que en términos generales todas tienen una forma esférica, sin embargo en la literatura también se han reportado "nanoesferas" que no tienen forma esférica (*Vauthier y Couvreur, 2000*).

Las nanoesferas se caracterizan por ser partículas en las cuales su masa es totalmente sólida, y pueden adsorber moléculas ya sea de manera superficial o encapsulándolas dentro de su estructura. Mientras que las nanocapsulas son sistemas vesiculares que tienen la función de actuar como un tipo de depósito, en el cuál las sustancias atrapadas se encuentran limitadas a una cavidad de núcleo líquido (que puede ser de tipo acuoso u oleico) rodeada por una cubierta sólida. En la figura 2.6 se representa un esquema de los tipos de nanopartículas.

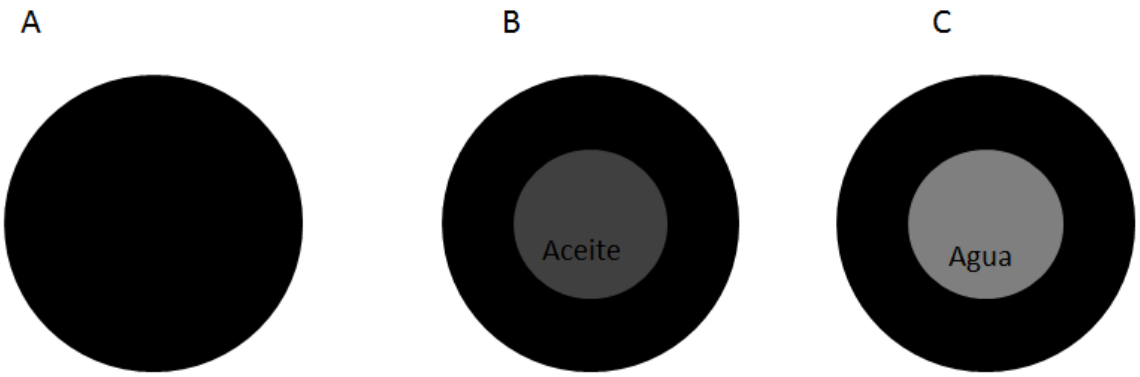


Figura 2.6. Ilustración de la clasificación de las nanopartículas poliméricas de forma (a) esférica, (b) nanocapsulas con núcleo de aceite y (c) con núcleo de agua

Las propiedades de las PNPs deberán ser optimizadas, dependiendo de la aplicación particular para la cual serán utilizadas. Para lograr obtener las propiedades deseadas, según el interés de la aplicación, la técnica de preparación de las PNPs jugará el papel más importante, por lo cual se describirán a continuación las técnicas más utilizadas.

2.4.1 Técnicas de preparación de nanopartículas.

Las PNPs pueden obtenerse de dos maneras distintas, primero, ya sea a partir de un polímero pre-formado o pueden ser sintetizadas directamente a partir de reacciones de polimerización de los monómeros, utilizando técnicas convencionales de polimerización, como por ejemplo emulsión, mini-emulsión, microemulsión, emulsión libre de tensioactivos polimerización iterfacial (*Geckeler y Stirn, 1993*).

Las técnicas más utilizadas para la obtención de PNPs a partir de la dispersión de un polímero pre-formado son: (1) evaporación del disolvente, (2) nanoprecipitación, (3) Proceso salting-out, (4) Diálisis y (5) Tecnología de fluidos supercríticos (supercritical fluid technology (SCF)). Por su parte, los procesos más

utilizados en para la polimerización de monómeros son: (1) emulsión, (2) mini y microemulsiones, (3) Emulsiones libres de agentes tensioactivos, (4) polimerización interfacial y (5) polimerización radicalaria viviente controlada (Controlled/living radical (C/LR)). En la figura 2.7 se muestra una ilustración de las diferentes técnicas de preparación de nanopartículas.

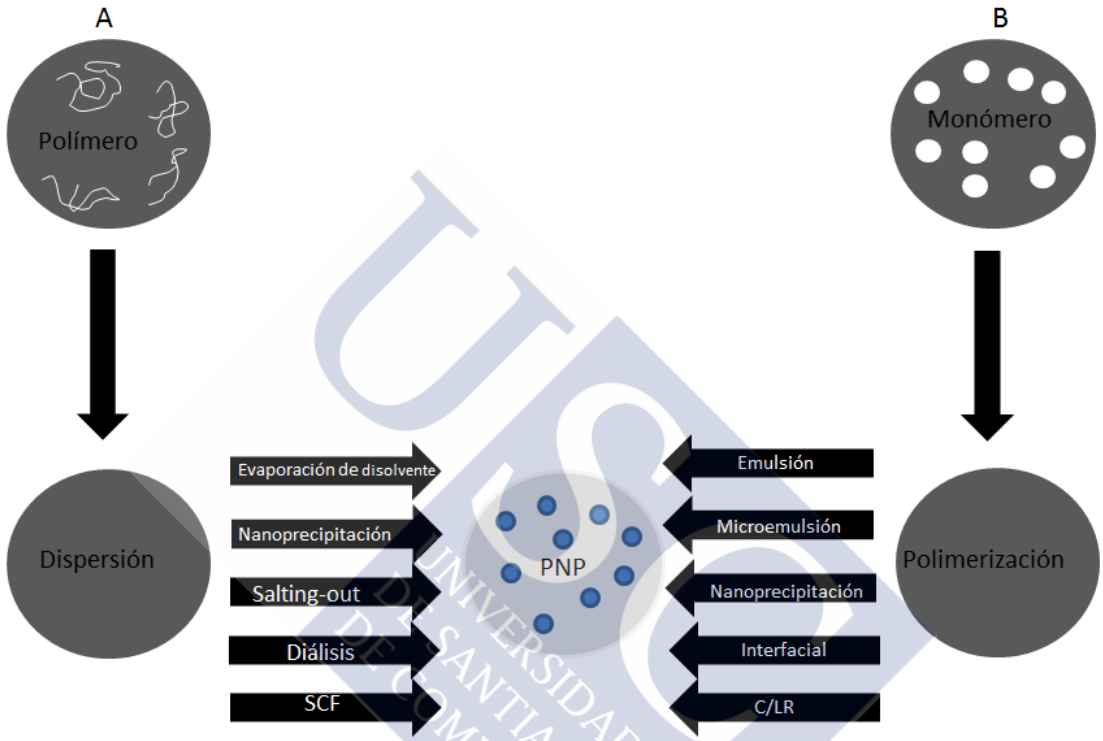


Figura 2.7. Representación esquemática e varias técnicas utilizadas para la preparación de PNPs, A partir de la (a) la dispersión de un polímero pre-formado, (b) reacción de polimerización de monómeros.

La elección del método de preparación de las nanopartículas dependerá de varios factores, como por ejemplo, el tipo de sistema polimérico, área de aplicación, diámetro de partícula requerido entre otros.

2.4.1.1 Técnicas por reacciones de polimerización.

Para obtener las nanopartículas (PNPs) con las propiedades deseadas para una aplicación particular, el material debe ser pre-diseñado. Este diseño se logra durante el proceso de polimerización de los monómeros elegidos. Los tres procesos de polimerización utilizados más comúnmente para la síntesis de estos materiales son la polimerización en mini-, micro-, y emulsión; sin embargo, también se han reportado otros métodos heterogéneos para su síntesis, como son la polimerización interfacial y la radicalaria viviente controlada.

A continuación se describen los procesos de polimerización más importantes en la síntesis de nanopartículas.

2.4.1.1.1 Polimerización en emulsión.

La polimerización en emulsión es un proceso muy utilizado a nivel industrial para producir polímeros debido a la facilidad de control de la reacción y, porque en contraste a las polimerizaciones en solución, masa y suspensión, se pueden obtener simultáneamente pesos moleculares grandes y velocidades de reacción rápidas. Al inicio de la polimerización en emulsión, el sistema consiste de micelas hinchadas con monómero, gotas de monómero, surfactante libre y monómero disueltos en agua. Al final de la reacción, el producto es un látex, esto es, una dispersión de partículas poliméricas de tamaño coloidal dispersas en agua. Estas partículas tienen diámetros del orden de 1.000 a 4.000 Å (*Odian, 1991; Rodriguez, 1984; Gilbert, 1995*).

La polimerización en emulsión presenta comúnmente la gran ventaja de sustituir los disolventes costosos por agua como medio de dispersión. Como por lo general los monómeros son insolubles en agua, es necesario agregar agentes adecuados (tensioactivos) para emulsificar el monómero. En una emulsión directa la reacción de iniciación se desarrolla en el medio acuoso y no en el interior o en la superficie de las micelas hinchadas con monómero o en las gotículas emulsificadas

de monómero. Las gotículas emulsificadas de monómero puro sólo sirven como depósito del monómero, el cual es cedido al medio acuoso o a las partículas que están polimerizando a medida que el monómero reacciona (*Flory, 1953*).

El proceso de polimerización se puede resumir en lo siguiente (*Harkins 1947*):

(i) Al inicio de la polimerización en emulsión, el sistema consiste de micelas hinchadas con monómero, gotas de monómero emulsificado, surfactante libre y monómero disuelto en agua (Figura 2.8a).

(ii) El iniciador se descompone en radicales libres en la fase acuosa, los cuales son capturados por las micelas para iniciar la polimerización del monómero solubilizado en ellas. Una vez que un radical entra en una micela, ésta se convierte en una partícula viva conteniendo polímero (Figura 2.8b).

(iii) El monómero se difunde desde las gotas de monómero hacia el interior de las partículas de polímero a través de la fase acuosa, lo cual permite mantener la reacción. A medida que las partículas crecen, éstas son estabilizadas (contra la coagulación) mediante la adsorción de surfactante de las micelas. Las partículas continúan creciendo hasta que un segundo radical entra y termina la reacción de polimerización. Un tercer radical puede reiniciar la polimerización; luego la entrada de otro radical puede terminar otra vez la reacción, y así sucesivamente hasta que todo el monómero se convierte en polímero.

(iv) Las micelas hinchadas con monómero desaparecen ya sea por la absorción de radicales para convertirse en partículas, o por la migración de su surfactante hacia las partículas que crecen (Figura 2.8c).

v) Las gotas de monómero desaparecen y ahora el monómero presente en las partículas que no estan reaccionando se transfiere a las partículas que si lo están (Figura 2.8d).

(vi) El producto final de la polimerización en emulsión es un látex, esto es, una dispersión de partículas poliméricas de tamaño coloidal en agua (Figura 2.8e).

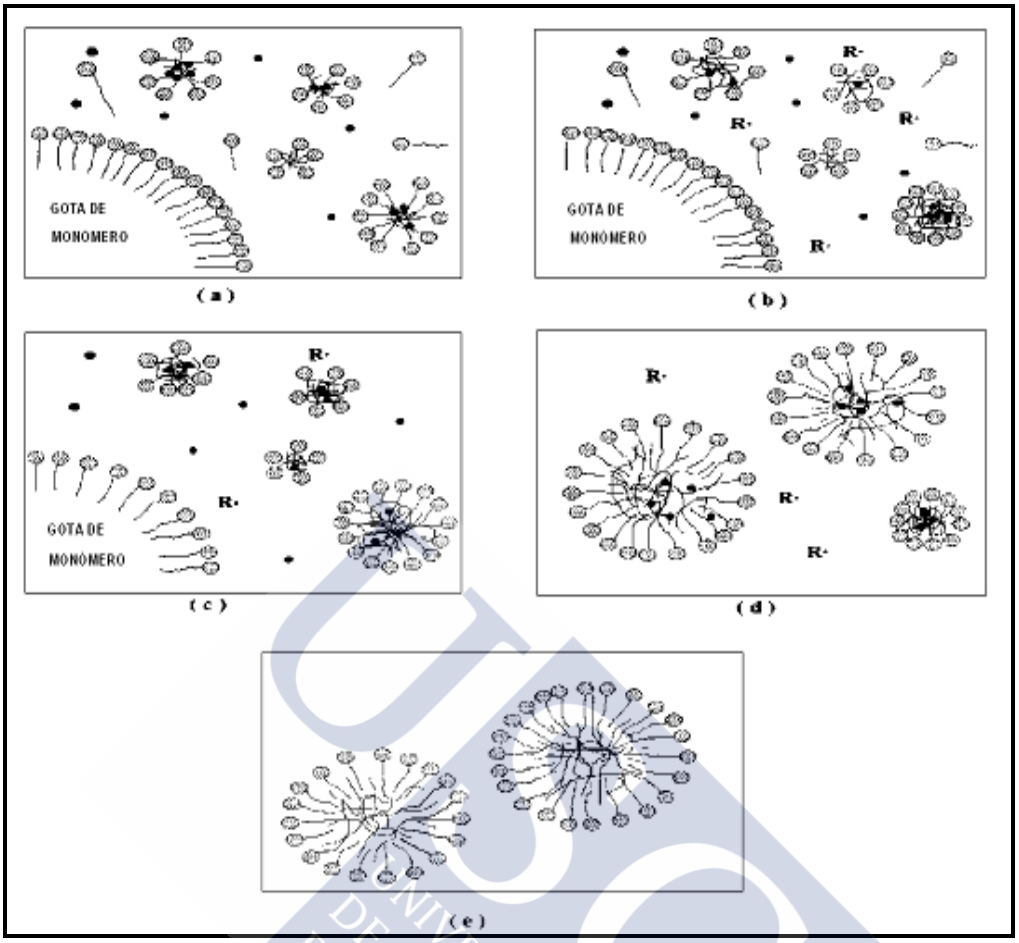


Figura 2.8. Representación de los diferentes pasos de polimerización en emulsión propuesta por Harkins.

2.4.1.1.2 Polimerización en microemulsión.

Cuando dos líquidos inmiscibles de diferente densidad (agua y aceite) son mezclados fuertemente mediante agitación y si no se agrega un agente estabilizante, las dos fases se separan en cuestión de segundos. Adicionando un agente tensoactivo se forman gotículas de un líquido dispersas en el otro y se logra la síntesis de una emulsión característica "estable" de apariencia lechosa. Continuando con la adición de dicho agente tensioactivo se puede notar cierto cambio en la apariencia de la emulsión; esta se vuelve transparente, formándose una dispersión coloidal de baja viscosidad llamada "microemulsión" (*Hiemenz, 1977*).

Un sistema en microemulsión es una modificación de la emulsión, en la cual es posible controlar mejor el diámetro de partícula, llevándola a tamaños mucho más pequeños que en la polimerización en emulsión (*Chow y Gan, 2005*), aumentando con esto, la posibilidad de poder inyectarlos en el cuerpo humano sin ningún inconveniente. Este control del diámetro de partícula corre a cuenta de las estructuras micelares del sistema, que funcionan como micro/nano–reactores, delimitando el área de la formación del polímero y, por lo tanto, delimitando el tamaño de la partícula.

Se han propuesto varios tipos de estructuras un sistema en microemulsión. El caso usual es aquel en el que el componente en menor concentración (sea agua o aceite) se encuentra en forma de gotículas esferoidales dispersas en el componente de mayor concentración, pero separadas por una película de tensioactivo (micelas hinchadas con monómero) (*Biesenberger, 1983*). A medida que se incrementa la concentración del componente minoritario, la curvatura de la película interfacial de tensoactivo tiende a cero y las gotículas tienden a juntarse y fusionarse en tubos multiconectados para formar estructuras bicontinuas. En la Figura 2.9 se muestra una imagen de los diferentes tipos de estructuras en una microemulsión.

a) Microemulsión directa (o/w): su estructura es de tipo globular, constituida por gotas de aceite dispersas en agua. Las partes polares están orientadas hacia el exterior de la micela, mientras que las cadenas hidrófobas están orientadas hacia el interior. Este tipo de microemulsión puede ser utilizada en el caso que los monómeros no sean solubles en agua.

b) Microemulsión inversa (w/o): su estructura es de tipo globular, constituida por gotas de fase acuosa dispersas en fase aceite. Las partes polares están orientadas hacia el interior de la micela y las cadenas hidrófobas están orientadas hacia el exterior. El medio continuo es el aceite. Este tipo de microemulsiones es una variable para cuando los monómeros son solubles en fase acuosa.

c) Microemulsión bicontinua: consiste en dominios de ambas fases interconectados entre sí.

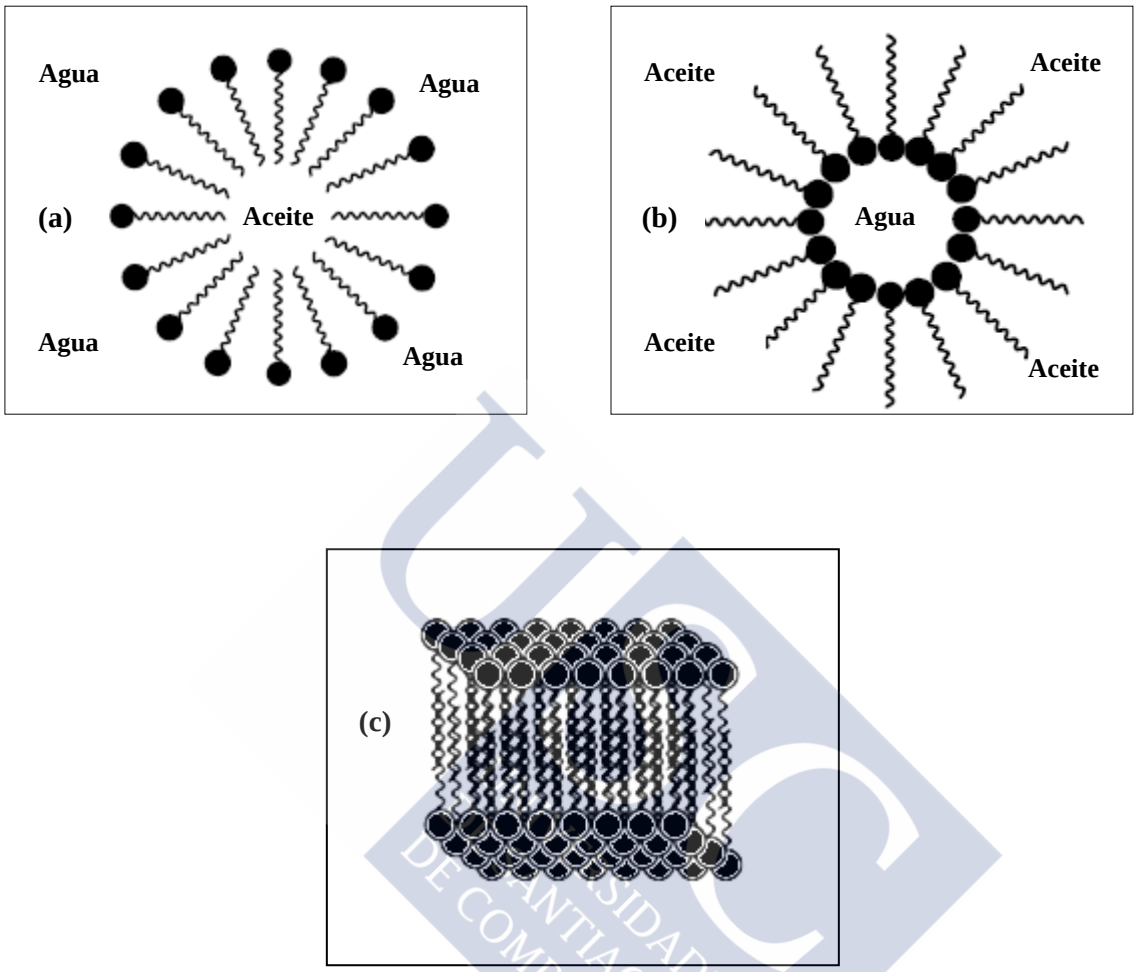


Figura 2.9. Representación de los tipos de microemulsión a) directa, b) inversa y c) bicontinua.

2.4.1.1.3 Polimerización en nanoprecipitación.

La polimerización por nanoprecipitación es un proceso de polimerización heterogéneo, en el cuál no se necesita de sustancias estabilizadoras tipo tensoactivos. Lo que supone una ventaja importante a nivel industrial, dado el elevado precio de los mismos en las formulaciones, y el coste adicional de purificación del polímero final, ya que los restos de estabilizantes son difíciles de eliminar (*Bamford et al., 1980; Li y Stöver, 1993; Romack et al., 1995*). Este

hecho, unido a las elevadas velocidades de la polimerización por precipitación han incrementado su popularidad en las últimas cuatro décadas en el ámbito industrial (*Juba, 1979*), y en los últimos años entre los métodos de síntesis de nanogeles, estableciéndose como un método ventajoso frente a la polimerización en emulsión.

La polimerización por precipitación (nano), se caracteriza por tener lugar en un medio que resulta ser buen disolvente de los monómeros, pero que sin embargo es un pobre o mal disolvente del polímero resultado de la polimerización (*Frank et al., 1998; Bunyakan y Hunkeler, 1999*). Este sistema, parte de un sistema homogéneo de una sola fase en la que monómeros e iniciador se encuentran perfectamente disueltos en el medio de reacción. Esta mezcla homogénea inicial simplifica las formulaciones de las mezclas de reacción. A medida que se produce el crecimiento de las cadenas poliméricas éstas precipitan, ya que el polímero en formación es insoluble o muy poco soluble en el medio, lo que origina una separación en dos fases en el sistema, y por tanto, un sistema heterogéneo.

La baja solubilidad del polímero en formación conduce a una continua nucleación y precipitación de partículas a medida que el polímero se forma. Estas pequeñas partículas de polímero precipitado arrastran en su interior el contenido reactivo disuelto en el medio capaz de polimerizar dentro de este nuevo recipiente de tamaño coloidal, en cuyo interior cada cadena radical es aislada del resto (*Murray, 1995*).

Como el polímero insoluble precipita, y además se emplean bajas concentraciones de monómero en este tipo de polimerización, las partículas precursoras no tienden a agregarse, lo que permite que se formen partículas aisladas de tamaños submicrométricos. De este modo, no es necesario añadir ningún tipo de sustancia estabilizante para que proporcione una barrera estérica, o eléctrica, que impida la aglomeración entre las partículas en crecimiento que conduciría a la obtención de sistemas de dimensiones superiores a los microgeles, algo que es común en otros tipos de polimerizaciones. Precisamente esta falta de estabilización coloidal adicional en ciertos sistemas puede traducirse en una

distribución ancha de tamaños de partícula de los geles formados (*Downey et al., 1999*).

Poersch y colaboradores desarrollaron a comienzos de la década de los noventa un modelo cinético para la polimerización por precipitación del ácido acrílico en tolueno, y llegaron a la conclusión de que era la fase heterogénea el único punto de polimerización, negando cualquier posibilidad de consumo de monómero en la fase homogénea (*Poersch et al., 1993*). Sin embargo, Hunkeler y Bunyakan algunos años más tarde, desarrollaron también para la polimerización por precipitación del ácido acrílico en tolueno, un modelo mecanístico basado en el esquema elemental de polimerización radical (iniciación, propagación, transferencia y terminación) capaz de predecir la conversión y el peso molecular del polímero en formación, que implica que la polimerización tiene lugar tanto en la fase homogénea, como en la fase heterogénea, con una importante transferencia de monómero entre ambas (*Bunyakan et al., 1999*).

Es importante mencionar que éste método de polimerización ha sido utilizado para la obtención de nanopartículas por medio de la síntesis de polímero a partir de monómero como también para la obtención de las mismas por medio de la dispersión de un polímero previamente formado.

2.4.1.1.4 Polimerización interfacial.

La polimerización interfacial es uno de los métodos establecidos para la síntesis de PNPs (*Landfester et al., 2010; Gaudin y Zydowicz, 2008; Wu et al., 2009*). Es un proceso de polimerización por pasos de dos agentes reactivos o monómeros, los cuales se disuelven respectivamente en dos fases (fase continua y fase dispersa), y la reacción se lleva a cabo en la interfase de ambos líquidos (*Karode et al., 1998*).

Este es un método que ha sido utilizado en polimerizaciones de poliadición y policondensación (*Crespy et al., 2007; Danicher et al., 2000; Torini et al., 2005*), así como también en polimerización radicalaria (Scott et al., 2005).

2.4.1.1.5 Polimerización radicalaria viviente controlada.

Una polimerización "viviente" es aquella que tiene lugar sin reacciones de terminación, es decir, que una vez consumido todo el monómero en el reactor (monómero transformado en polímero), las cadenas poliméricas aún se encuentran activas. Esto quiere decir que si adicionáramos más monómero a nuestro reactor, éste continuaría polimerizando.

La polimerización radicalaria viviente tenía algunas limitaciones, principalmente la falta de control sobre el peso molecular, la distribución de pesos moleculares, la terminación de las moléculas reactivas y por lo tanto la estructura molecular del polímero. Estas limitaciones eran causadas por la inevitablemente rápida terminación radical-radical de las reacciones. Por medio de la polimerización radicalaria viviente controlada (C/LRP) se han logrado controlar estos problemas, por lo que se ha abierto una nueva área de síntesis a partir de la modificación del método radicalario anterior (*Matyjaszewski y Xia, 2001; Zetterlund et al., 2007 y 2008*).

La técnica de C/LRP ha creado un amplio espectro de oportunidades para la síntesis de nanopartículas (PNPs) con gran potencial de aplicaciones.

2.4.1.2 Técnicas por dispersión de un polímero preformado.

Diferentes métodos para la preparación de nanopartículas (PNPs) por medio de la dispersión de un polímero pre-formado han sido desarrollados y exitosamente utilizados.

2.4.1.2.1 Evaporación del disolvente.

Fue el primer método para dispersar un polímero a nanopartículas (*Vanderhoff et al, 1979)*. En este método, las soluciones poliméricas son preparadas en solventes volátiles y posteriormente se forma una emulsión.

Anteriormente, el diclorometano y el cloroformo eran los solventes más comunes, pero ahora han sido reemplazados por el etil acetato (el cual tiene un mejor perfil toxicológico). La evaporación del disolvente da el paso a la conversión de emulsión a la suspensión de las nanopartículas. Por último, las nanopartículas sólidas se obtienen por ultracentrifugación y se lavan varias veces con agua destilada para eliminar los restos de aditivos como los tensioactivos (*Allemann et al, 1993; Anton et al, 2008*).

2.4.1.2.2 Proceso Salting-Out.

Es una modificación del proceso de emulsión, en el cual no se utilizan tensioactivos ni solventes clorinatados. Fue descrito por primera vez por Bindschaedler y colaboradores en 1990. La emulsión es formulada a partir de un solvente que es comúnmente miscible en agua, como por ejemplo acetona y la emulsificación de la solución polimérica en la fase acuosa se logra por medio del efecto Ouzo (*Ganachaud y Katz, 2005*) mediante la disolución de alta concentración de sal o sacarosa para lograr un fuerte efecto de desplazamiento salino en la fase acuosa. Cloruro de magnesio, cloruro de calcio y acetato de magnesio son los electrolitos más utilizados (*Alleman et al., 1992; De Jaeghere et al., 1999; Nguyen et al., 2003; Zweers et al., 2004; Galindo-Rodriguez et al., 2005*).

2.4.1.2.3 Diálisis.

En este método, el polímero es disuelto en un disolvente orgánico (A) y se coloca dentro de un tubo de diálisis que tenga un peso molecular adecuado. La diálisis se lleva a cabo cuando las concentraciones del disolvente (A) dentro de la membrana tratarán de equilibrarse contra la concentración de un no disolvente (B) del polímero, que sea miscible con el anterior disolvente (A) y viceversa. El desplazamiento del disolvente dentro de la membrana es seguido por la agregación

progresiva del polímero debido a una pérdida de la solubilidad y la formación de suspensiones homogéneas de las nanopartículas.

El mecanismo de formación de PNPs por medio del método de diálisis no está completamente descrito hasta el momento, sin embargo se piensa que podría ser un mecanismo similar al de nanoprecipitación propuesta por Fessy y colaboradores en 1989; lográndose obtener una gran cantidad de nanopartículas por este método (*Jung y col., 2007; Liu y col., 2007; Faheem y col., 2009; Errico y col., 2009*).

2.4.1.2.4 Tecnología de fluidos supercríticos (SCF).

Un fluido supercrítico es aquel que posee propiedades de un disolvente, que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a las de un gas. Por lo tanto, se comporta como un híbrido entre líquido y gas cuando la presión y la temperatura a la que se encuentre el fluido este por arriba de su punto triple. De esta manera, un fluido supercrítico no solo puede disolver solutos sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetraren los poros de los sólidos.

La necesidad de encontrar métodos ambientalmente más seguros en cuanto a la producción de PNPs, ha motivado a los investigadores a utilizar fluidos supercríticos para su utilización, ya que son solventes "amigables" para el medio ambiente (*York, 1999; Kawashima, 2001*).

Se espera que esta tecnología pueda ofrecer una técnica interesante y eficaz para la producción de partículas, evitando la mayor parte de los inconvenientes de los métodos tradicionales; por ello se han publicado algunos trabajos interesantes en la formación, formulación y control de la obtención de PNPs con fluidos supercríticos (*Reverchon, 1999; Jung y Perrut, 2001; Shariati y Peters, 2003; Vemavarapu et al., 2005; Mishima, 2008*).

CAPÍTULO 3

SECCIÓN EXPERIMENTAL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Este capítulo de la memoria se dividirá en dos secciones principales, por un lado, la sección "materiales", en donde se detallarán las características de los reactivos utilizados durante la investigación para el sustento de esta memoria, así como también los procedimientos experimentales que se siguieron para la obtención de nuestros resultados. Por otro lado, en la sección "Técnicas experimentales", se describirán los fundamentos teóricos de las técnicas experimentales utilizadas.

3.1. Materiales y métodos.

En este bloque se presenta la información necesaria sobre los reactivos y procedimientos experimentales para la obtención de los nanohidrogeles copoliméricos. Se describirá la procedencia de cada reactivo y su pureza, así como si ha sido usado directamente o se ha realizado algún procedimiento extra para su utilización.

Es importante recordar que se tiene como punto de partida la obtención de nanopartículas copoliméricas de poli(N-isopropilacrilamida-co-metacrilato de 2-dietilamino etilo), y tras ser sintetizadas y caracterizadas, serán modificadas para obtener conjugados folato y estudiar sus propiedades para poder ser utilizados en la liberación de algunos fármacos anticancerígenos.

3.1.1. Síntesis de nanohidrogeles de P(NIPA-co-DEA) vía polimerización en microemulsión.

Materiales

Para la síntesis de las nanopartículas , se han utilizado los monómeros N-Isopropilacrilamida (NIPA) (Acros Organics, 99%) y Metacrilato de 2-dietiamino etilo (DEA) (Sigma Aldrich, 99%). Como agente entrecruzante se utilizó la N, N-metilénbisacrilamida (NMBA) (Merck ≥ 98%). El sistema tensioactivo se compuso de hexaoleato de sorbitol polietoxilado (ATLAS G-1086) (99%) y el sesquiolato de sorbitán (ARLACEL 83) (98%) y como fase dispersa la isoparafina sintética hidrocarbonada (ISOPAR M) (98%) y para la disminución del diámetro de partícula se utilizó la sal Fosfato de dibutilo (FDB) (Sigma Aldrich, ≥97%), todos fueron utilizados como se recibieron. Como iniciador se utilizó el disulfito sódico (DSNa) ($Na_2S_2O_5$) (Merck, 98%). La fase continua fue agua miliQ ®. Se utilizó acetona grado reactivo (Panreac) para la precipitación de la microemulsión y para la purificación de las nanopartículas se usó dietil éter (Panreac, 99.5%).

En la figura 3.1 se muestran las estructuras de los monómeros utilizados para la síntesis de las nanopartículas, así como el agente entrecruzante.

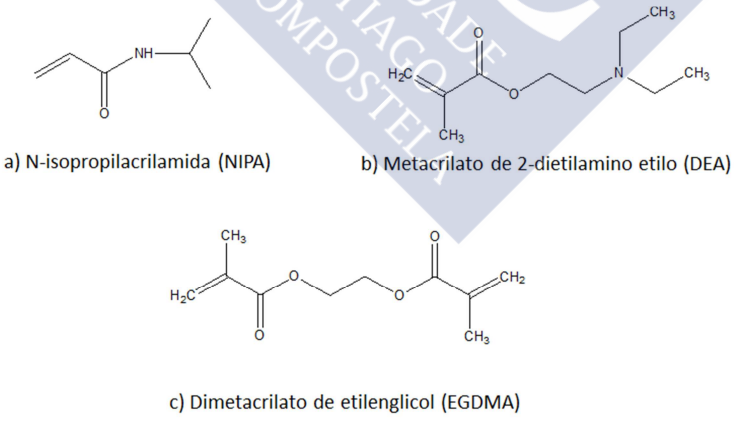


Figura 3.1. Estructura química de los monómeros utilizados en la síntesis de los nanohidrogeles (a y b) y del agente entrecruzante (c).

Procedimiento

La síntesis de los nanohidrogeles de NIPA-co-DEA fue realizada en un proceso de microemulsión directa, en el que se empleó hexaoleato de sorbitol polietoxilado (ATLAS G-1086) como tensioctivo y el sesquioleato de sorbitan (ARLACEL 83) como co-tensioactivo. Los valores de HLB para los tensioactivos corresponden a 10,2 y 3,7 respectivamente.

En la figura 3.2 se muestra el esquema de la reacción de Copolimerización para los nanogeles de NIPA-co-DEA por vía radicalaria.

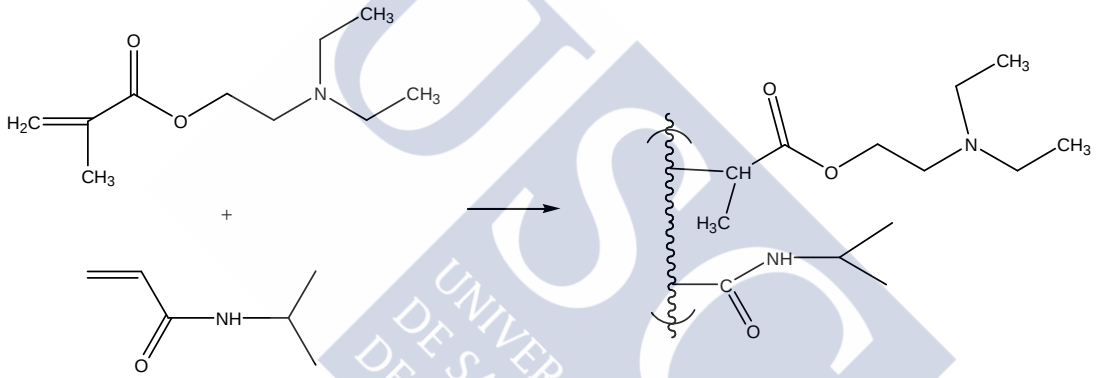


Figura 3.2. Esquema de la reacción de Copolimerización radical de formación de nanogeles.

El estudio de la estabilización de la microemulsión utilizada para esta síntesis, fue estudiada anteriormente por el grupo de Nuevos Materiales y espectroscopia supramolecular de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (*Guerrero-Ramírez, Tesis Doctoral, 2009*), en donde se fijó un valor de HLB óptimo de 9,5; para esto fue necesario considerar los valores de HLB del tensioactivo y del co-tensioactivo que como mencionamos anteriormente correspondían a 10,2 para el ATLAS G-1086 y de 3,7 para el ARLACEL 83. La composición de los agentes tensioactivos para obtener el valor deseado de HLB fue de 95% de ATLAS G-1086 y un 5% de ARLACEL 83.

Una vez considerado el valor del HLB para nuestro sistema, se procedió a iniciar con la formación de la microemulsión, la cual se conformó de un 58% en peso (del total de la microemulsión) de la fase acuosa (esta fase contiene los monómeros y el agente entrecruzante); un 17% (del total de la microemulsión) correspondió a la fase oleica (que contiene el aceite utilizado para el sistema (ISOPAR M)) y por último, un 25% de sistema tensioactivo que como hemos mencionado anteriormente, correspondió a una proporción de ATLAS G-1086-ARLACEL 83 en un 95-5%, respectivamente.

El procedimiento para la formación de la microemulsión es el siguiente; primero se prepara la fase acuosa, en la cual el 80% de la fase es agua miliQ y el 10% restante corresponde a los monómeros, los cuales son disueltos en el agua, aquí es importante mencionar que para la disolución del monómero DEA, se disminuyó el pH de la solución monomérica hasta pH 5, con una disolución de HCl (0,5 M); a esta disolución monomérica se le agregó el agente entrecruzante (NMBA, en base a la cantidad de monómeros totales) y la sal fosfato de dibutilo (hasta un 5% del total de la fase acuosa) y se mantuvo en agitación constante durante aproximadamente 30 minutos hasta homogeneización. Después, en otro recipiente, se disolvieron tanto la mezcla de surfactantes como la fase oleica de la microemulsión.

Una vez preparadas ambas fases, se introdujeron en un reactor mecánico IKA (figura 3.4) equipado con un sistema de dosificación, agitación mecánica y sistema de refrigeración. Se dejó burbujear nitrógeno (N_2) para saturar el sistema durante 20 minutos, a una velocidad de agitación de 136 rpm, y se programó la temperatura del sistema de refrigeración en 25°C. Transcurrido este tiempo, se introdujo un termopar en el sistema de reacción para controlar la variación de la temperatura con respecto al proceso de síntesis. Una vez saturado el sistema de nitrógeno, se procedió a agregar el iniciador (DSNa, en función de la cantidad de monómeros totales). Al agregar el iniciador, el sensor de temperatura registró un aumento progresivo hasta alcanzar el equilibrio (aproximadamente hasta 38°C),

una vez alcanzado el equilibrio, la temperatura fue disminuyendo gradualmente hasta recuperar su valor inicial de 25°C.

A continuación se muestra en la figura 3.3 el esquema general de la síntesis de microemulsiones directas para la obtención de las nanopartículas de poli(NIPA-co-DEA).

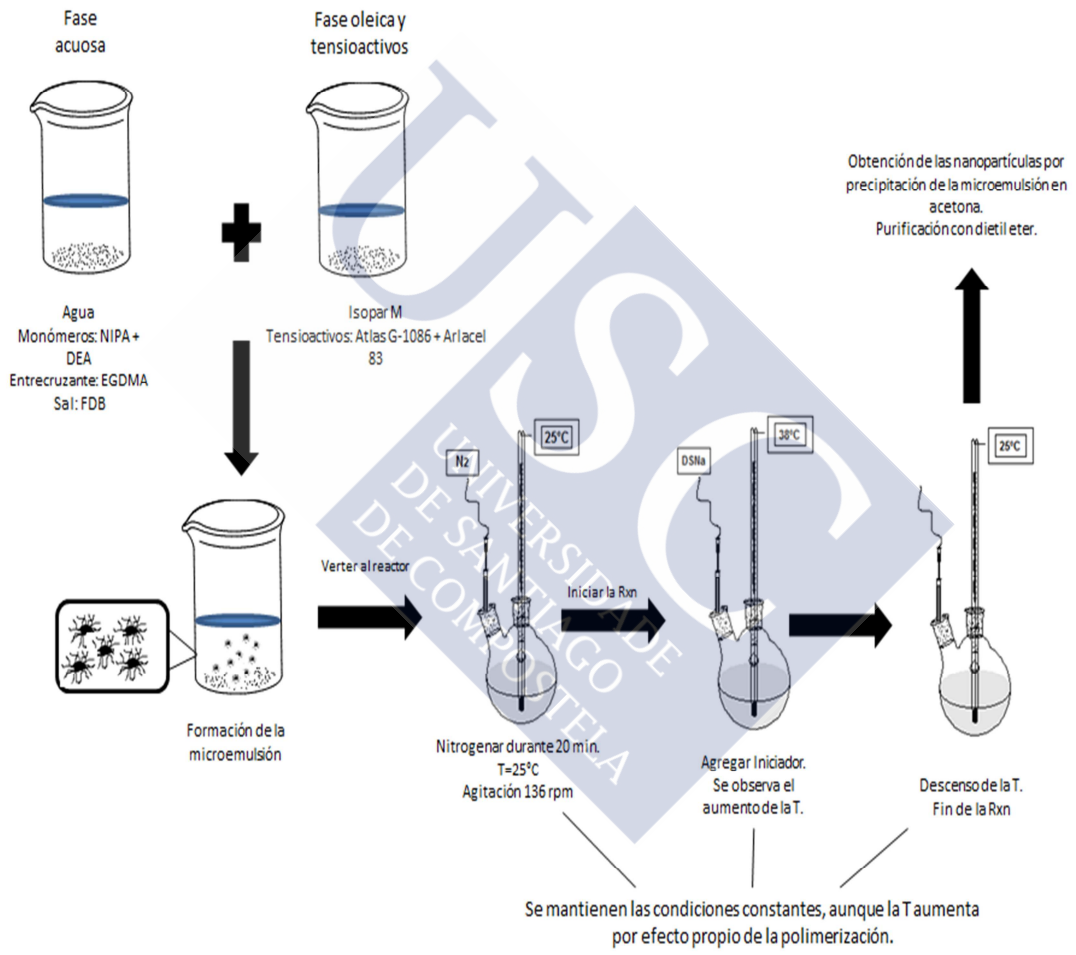


Figura 3.3. Esquema de la formación de la microemulsión y procedimiento de síntesis de los nanohidrogeles.

Una vez finalizada la reacción de copolimerización, se obtuvieron las nanopartículas mediante la precipitación de la misma. El precipitante fue acetona

grado reactivo en una proporción de 3:1; esto es, que cada 100 ml de microemulsión se agregaron gota a gota sobre 300 ml de acetona, manteniendo una agitación constante de 400 rpm. Después de este proceso, se observó la aparición de las nanopartículas en forma de polvo. Este polvo se dejó sedimentar y se retiró la acetona. Para la eliminación de los agentes tensioactivos utilizados para la estabilización del sistema y los residuos de monómeros (monómero que no polimerizó) se "lavaron" las nanopartículas en dietil éter. Se realizaron 5 lavados de 50 ml del solvente. Después de esto, las nanopartículas se dejaron secar en una estufa a T = 40°C durante un periodo de 24 horas. Por último, una vez purificadas y secas, se almacenaron en viales tubulares color ámbar y se mantuvieron en ambiente seco para realizar las pruebas siguientes.

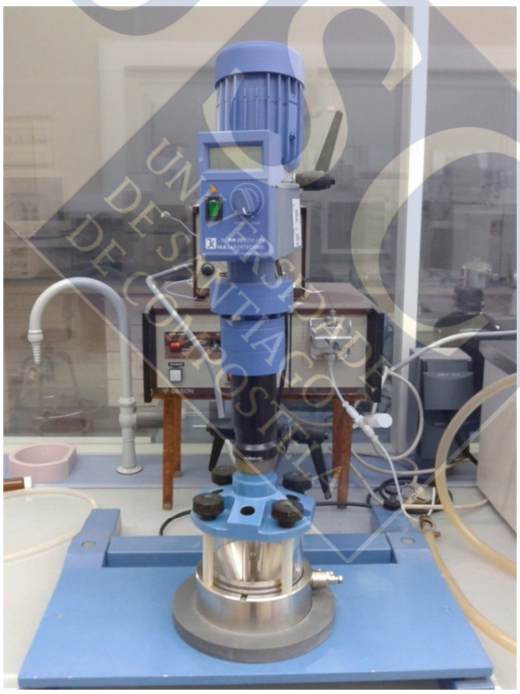


Figura 3.4. Fotografía del reactor marca IKA utilizado para los procesos de síntesis de nanohidrogeles.

3.1.2. Síntesis de nanohidrogeles de Poli(NIPA–co–DEA) vía polimerización en nanoprecipitación.

Materiales

Para la síntesis de las nanopartículas por nanoprecipitación, se han utilizado los monómeros N-Isopropilacrilamida (NIPA) (Acros Organics, 99%) y Metacrilato de 2-dietiamino etilo (DEA) (Sigma Aldrich, 99%). Como agente entrecruzante se utilizó la N, N-metilénbisacrilamida (NMBA) (Merck ≥ 98%). El medio de polimerización se compuso de agua miliQ ® y de acetona para análisis (Merck, ≥99.8%). La reacción se inició con disulfito sódico (DSNa) ($Na_2S_2O_5$) (Merck, 98%).

Procedimiento

Para la síntesis de nanopartículas de poli(NIPA–co–DEA) se eligió como segundo método de polimerización la nanoprecipitación. El sistema se conformó de una fase disolvente de los monómeros (agua) y de un co–solvente, que en este caso fue la acetona. La proporción de agua y acetona correspondió a un 85-15% respectivamente. Mientras que los monómeros se agregaron en un 3% respecto a la mezcla disolvente y de este 3%, se varió la relación monomérica de NIPA y DEA. En la figura 3.1 se muestra la imagen de las estructuras moleculares de los monómeros y del agente entrecruzante.

La reacción se llevó a cabo de la siguiente forma: el monómero N-isopropilacrilamida (NIPA) fue disuelto en 85 gramos de agua milliQ, posteriormente se añadió a esta disolución el monómero metacrilato de 2-dimetilamino etilo (DEA); para la disolución de este monómero, fue necesario bajar el pH de la solución alrededor de 5. Una vez disueltos ambos monómeros, se agregó gota a gota la acetona. Después de esto se añadió el agente entrecruzante (N, N-metilénbisacrilamida), en el porcentaje deseado de entrecruzamiento con respecto a la cantidad de monómeros. La velocidad de agitación se mantuvo siempre constante a 200 rpm. Cuando el medio de reacción estuvo perfectamente homogéneo, se dejó burbujear nitrógeno (N_2) por un periodo de 20 minutos.

Transcurrido este tiempo se agregó un mililitro de solución de iniciador (1,58 M) y el reactor se selló perfectamente y se dejó polimerizar a temperatura de 23°C. La reacción se dio por concluida cuando transcurrió un tiempo 48 horas. Por medio de rotoevaporación al vacío se eliminó la acetona y para la completa eliminación del agua, la muestra se secó en una estufa (J.P Selecta, modelo 2005142) a una temperatura de 60°C por un periodo de 48 horas. Para eliminar los restos de monómeros residuales, el polímero se lavó con agua miliQ (pH 5 ajustado con una solución de HCl 0,1 M), separando las nanopartículas por centrifugación (Centrifuga Eppendorf modelo 5804 R) a una velocidad de 10.000 rpm, repitiendo este proceso 5 veces. Las nanopartículas nuevamente se llevaron a la estufa (T = 60°C) y cuando estuvieron perfectamente secas se almacenaron en viales tubulares color ámbar y se mantuvieron en ambiente seco para realizar las pruebas siguientes.

En la figura 3.5 se muestra la figura del equipo utilizado para la síntesis de los nanohidrogeles por el método de polimerización en nanoprecipitación y en la figura 3.6 el esquema de síntesis por este mismo método de polimerización.

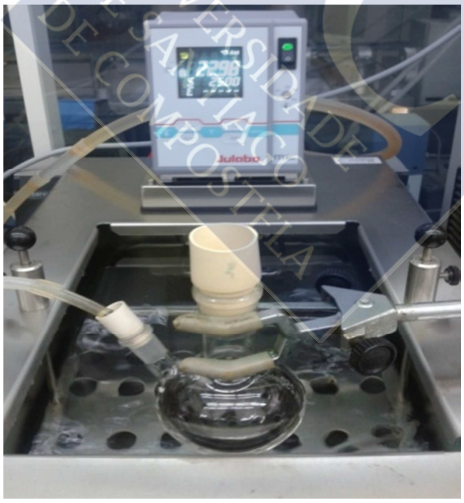


Figura 3.5. Montaje del sistema de polimerización en nanoprecipitación.

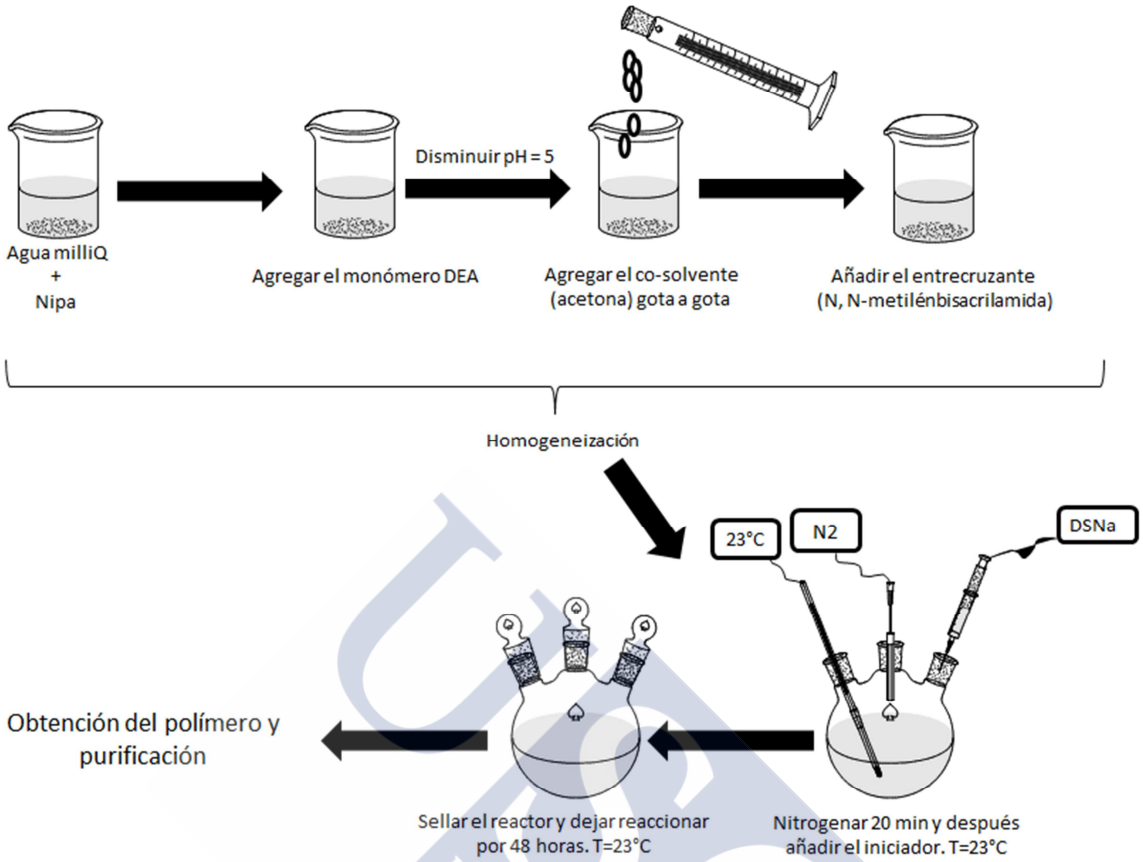


Figura 3.6. Esquema de síntesis de los nanohidrogeles por el método de polimerización en nanoprecipitación.

3.1.3. Liberación de fármacos.

Como se ha mencionado anteriormente, en la introducción de este trabajo, las nanopartículas que presentan un cambio de volumen en respuesta a un cambio de pH son sistemas con un gran potencial para ser utilizadas como transportadores de fármacos, ya que este cambio de pH permitirá una liberación específica.

Los nanohidrogeles sintetizados en este trabajo, presentan una transición de volumen con respecto al pH del medio externo, por lo que han sido cargadas con diferentes fármacos tales como: el 5–fluoracilo, la metformina y la terfenadina, con el objetivo de evaluar la capacidad de liberación para dichos fármacos.

3.1.3.1. Carga de fármaco en los nanogeles.

Materiales

Nanogeles sintetizados (NIPA-co-DEA), entrecruzados a diferentes porcentajes con EGDMA. Fármacos: 5-fluoracilo y terfenadina adquiridos de Sigma-Aldrich, e hidrocloruro de metformina (99,7%) de Fagron. NaOH (Panreac 0,1 N), HCl (Panreac, 0,5 N), etanol (96%) Panreac y agua miliQ.

Procedimiento

En primer lugar se cargaron los nanogeles previamente sintetizados, con cada uno de los fármacos. Para esto, se prepararon soluciones acuosas (5-fluoracilo y metformina) y soluciones en etanol (terfenadina), variando las concentraciones del fármaco ($1{,}0\cdot10^{-3}$, $2{,}5\cdot10^{-3}$ y $4{,}5\cdot10^{-3}$ M).

El procedimiento de carga fue el siguiente: se pesó la cantidad de fármaco (5–FU, metormina o terfenadina) necesaria para tener la concentración deseada ($1{,}0\cdot10^{-3}$, $2{,}5\cdot10^{-3}$ y $4{,}5\cdot10^{-3}$ M) y se disolvió en 50 ml de agua o de etanol (según la solubilidad de cada fármaco). Una vez preparada la solución, se dispersaron en ella 0,5 g de nanogeles. Posteriormente se hizo descender el pH hasta 5,5 mediante la adición de HCl. La mezcla se dejó en agitación por un periodo de 24 horas para asegurar el completo hinchamiento de la red polimérica y por lo tanto la internalización del fármaco dentro de su estructura. Para recuperar los nanogeles cargados se centrifugó la solución. La cantidad de fármaco cargado en los nanogeles se calculó por medio de la diferencia de absorbancia entre la solución de fármaco inicial y la solución de fármaco después de la carga de los nanogeles por ultravioleta visible, (5-fluoracilo λ = 265 nm, metformina λ = 233 nm, y terfenadina λ = 259 nm).

Los nanogeles fueron purificados mediante tres ciclos sucesivos de lavado en un tampón fosfatos (pH = 7,4) y centrifugado.

3.1.3.2. Determinación de la cantidad de fármaco liberado.

Materiales

Nanopartículas sintetizadas, cargadas con alguno de los fármacos seleccionados (5–Fu, metformina, o terfenadina) y previamente purificadas, NaOH (Panreac, 0,1 N), HCl (Panreac, 0,5 N), Agua miliQ.

Procedimiento

La capacidad de liberación de cada uno de los fármacos previamente cargados en los nanogeles se determinó por ultravioleta visible. Para esto, 10 mg de nanogeles fueron dispersados en 50 ml de agua miliQ y la dispersión se ajustó a un pH de 7,4. Una vez que los nanogeles estuvieron perfectamente dispersados, se procedió a cambiar el pH, bajándolo hasta 5,5 con una solución de HCl 0,5 N. Esta dispersión a pH 5,5 se mantuvo en agitación constante de 250 rpm por un periodo de tiempo de 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los nanogeles se separaron de la solución por medio de centrifugación (10.000 rpm). La cantidad de fármaco liberado se calculó como la diferencia de la absorbancia (utilizando la longitud de onda correspondiente para cada uno de los fármacos) de la disolución a pH fisiológico (7,4) y pH ácido (5,5).

3.1.3.3. Cinéticas de liberación de fármacos.

Materiales

Nanopartículas sintetizadas, cargadas con alguno de los fármacos seleccionados (5–Fu, metformina, o terfenadina) y previamente purificadas, NaOH (Panreac, 0,1 N), HCl (Panreac, 0,5 N), Agua miliQ.

Procedimiento

Las pruebas de cinéticas de liberación se llevaron a cabo para conocer el tiempo determinado que tarda cada uno de los fármacos en ser liberados desde la matriz de los nanogeles hacia el medio de contacto.

El medio de liberación del fármaco fue el agua miliQ, la cual fue primeramente ajustada al pH al cual se realizaría la determinación (5,4 o 7,4), posteriormente, con esta solución se realizó una medición blanco en el ultravioleta visible (espectro fotómetro Cintra modelo 303 de doble haz, GBC Instruments). La solución se conectó al UV-Vis a través de una bomba peristáltica de flujo con una termocelda de control de temperatura, con el fin de realizar las lecturas con un flujo constante a una temperatura específica.

3.1.4. Estrategia de funcionalización con el ligando ácido fólico.

Para llevar a cabo la funcionalización de los nanogeles con el ácido fólico, se utilizó el método EDC, el cual se describirá más adelante. Sin embargo, para la utilización de este método, se requiere que los nanogeles contengan en su estructura grupos funcionales amina libre.

Por esta razón, se ha incorporado a la matriz polimérica el monómero 2-acril amidoetil carbamato (2AAECM) (figura 3.7), el cual a través de una reacción de aminólisis, nos proporcionará dichos grupos funcionales.

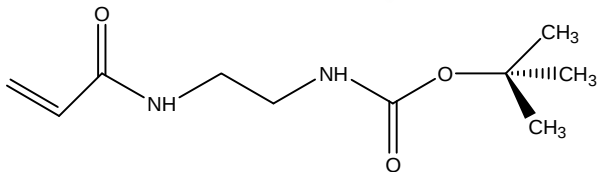


Figura 3.7. Estructura Química del monómero 2-Acril amidoetil carbamato (2AAECM).

3.1.4.1. Síntesis del monómero 2-Acril amidoetil carbamato (2-AAECM).

La síntesis del monómero 2-acril amidoetil carbamato, que a partir de ahora denominaremos 2AAECM, está fundamentada en el hecho de que pueda ser utilizado posteriormente para incorporar la funcionalidad del receptor específico (que en este caso será el ácido fólico) en un proceso de post polimerización. Para lograr este acoplamiento es necesario que el grupo funcional, que reaccionará con el ligando, se encuentre un poco alejado de la matriz polimérica para evitar impedimentos de tipo estérico, es por eso que la síntesis de este monómero requiere de la formación de un pre-monómero, ya que la molécula precursora del monómero no es un producto comercial. Partiremos para ello de la etiléndiamina y, para poder controlar la entrada del grupo vinilo en un paso subsecuente, es necesario proteger sólo uno de los dos grupos funcionales amina de este compuesto, de manera que pueda reaccionar y formar el monómero, y en un proceso post polimerización sea capaz de reaccionar con el ácido fólico generando el receptor específico.

Materiales

Etilendiamina (Aldrich 98%), el cloruro de acriloílo (Aldrich 96%), di-*ter*-butil dicarbonato anhidro (BOC) (Aldrich 97%) y el diclorometano (Aldrich 98%), que fueron utilizados sin purificación adicional.

Adicionalmente se emplearon reactivos como, por ejemplo, cloroformo (para análisis 99%), el acetato de etilo (99,8%), la trietilamina (E3t) (98% de pureza).

Procedimiento

El procedimiento de mono-protección de la etilendiamina comienza con la disolución de ésta (20 g, 0,33 mol) en diclorometano (180 mL), en un balón de reacción de 3 bocas equipado con un refrigerante y un embudo de adición. Se enfría dicha disolución introduciéndola en un baño de hielo con sal (-19ºC). A continuación, se añade gota a gota una disolución de BOC-anhídrido (18g, 0,082

mol) en diclorometano (91 mL) a una velocidad aproximada de 1,7 mL/min. Una vez añadido el reactivo se deja atemperar la mezcla, que se mantiene bajo agitación durante 16 h. Tras este periodo de tiempo, se evapora el disolvente y se añade agua (90 mL). A continuación se filtra el precipitado blanco correspondiente a la amina diprotegida que se forma como producto secundario y que precipita en agua. El filtrado se satura con cloruro sódico y el producto es extraído con acetato de etilo (3 x 50 mL). Se combinan los extractos orgánicos y se secan con sulfato sódico anhidro. El sulfato se filtra y el filtrado se concentra a vacío dando lugar a un aceite de color claro. Para eliminar los restos de NaCl, el aceite se redisuelve en cloroformo y se filtra la disolución. Finalmente, se evapora el disolvente y el producto de la reacción se seca a vacío. Un esquema de la obtención del pre-monómero se muestra en la figura 3.8.

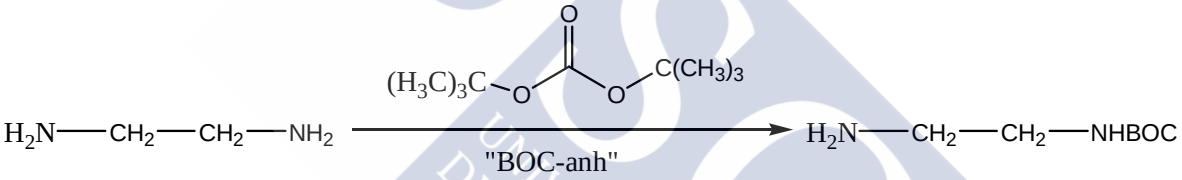


Figura 3.8. Esquema de la síntesis del pre-monómero NHBOC.

Una vez obtenido el pre-monómero, que denominaremos NHBOC, nos dispondremos a hacerlo reaccionar con cloruro de acriloílo, para obtener un monómero reactivo.

En el procedimiento experimental, se equipa el sistema con un refrigerante, un embudo de adición, y un sensor de temperatura; la mezcla de reacción se lleva a una temperatura de -20 $\pm$ 5ºC empleando nitrógeno líquido y se mantiene bajo agitación magnética constante. Ahora, en el embudo de adición se introduce el NHBOC disuelto en diclorometano (20 mL); adicionalmente se introduce TEA que actuará como reactivo neutralizador del ácido clorhídrico que se formará como producto de la reacción principal (figura 3.9). Nuevamente, hay que tener en

cuenta las relaciones estequiométricas al momento de preparar los reactivos antes de la síntesis.

Una vez alcanzada la temperatura de reacción, la mezcla de NHBOC/TEA se deja gotear sobre el cloruro de acriloílo. Aparecerá un precipitado de color blancuzco (2AAECM). El procedimiento experimental para la purificación implica la disolución del monómero y su subsecuente precipitación en acetona.

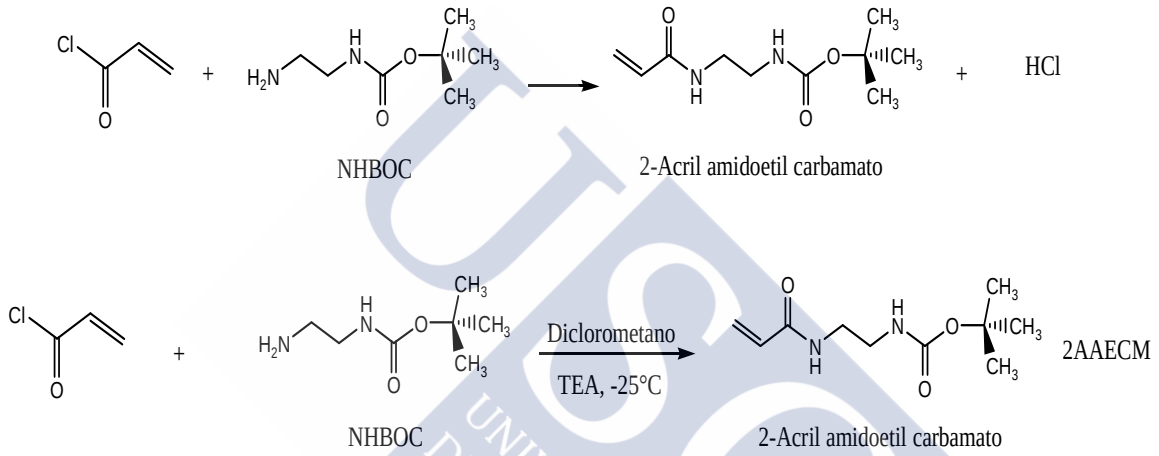


Figura 3.9. Reacción de síntesis para la obtención del monómero 2AAECM.

3.1.4.2. Incorporación del monómero 2-AAECM a las nanoparticulas.

Como se ha mencionado anteriormente, el monómero 2-AAECM fue sintetizado previamente para después ser incorporado en la matriz polimérica de los nanohidrogeles y proveer de grupos funcionales disponibles para la post incorporación del ligando ácido fólico.

La síntesis de éste terpolímero se llevó a cabo por los dos diferentes tipos de polimerización utilizados para la síntesis de los copolímeros (microemulsión y nanoprecipitación) por lo que se siguió el mismo procedimiento que en los apartados 3.1.2 y 3.1.3, variando solamente la incorporación de éste tercer monómero en la fase monomérica correspondiente. El nanohidrogel sintetizado es

un terpolímero entrecruzado con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) al igual que las nanopartículas de NIPA

En la figura 3.10 se muestra el esquema de obtención para las nanopartículas de NIPA-DEA-2AAECM.

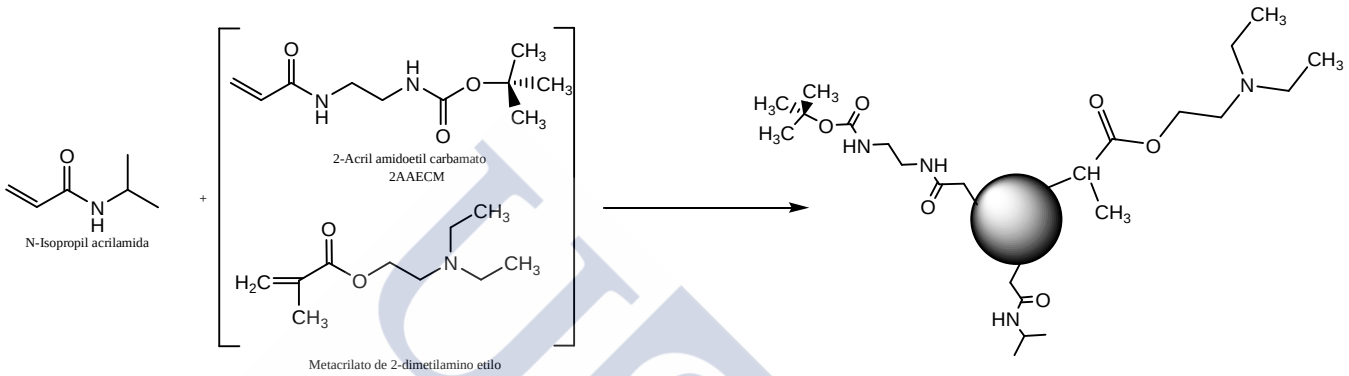


Figura 3.10.Esquema de reacción de los monómeros NIPA, DEA y 2AAECM en la síntesis para la obtención de nanohidrogeles terpoliméricos.

3.1.4.3. Obtención de nanohidrogeles inteligentes funcionalizados con el ligando ácido fólico.

Como ya se ha comentado en la parte teórica de esta memoria, el ácido fólico es una molécula de especial interés en los modernos tratamientos anticancerígenos. El origen de esto radica en el hecho de que en los últimos años se ha encontrado que existen muchos más receptores tipo folato en las células cancerígenas que en las células sanas. Esta especificidad convierte al ácido fólico en un ligando de infinidad de sistemas de liberación controlada de fármacos (dentro de los que destacan las matrices poliméricas).

El ácido fólico es una molécula orgánica con varias propiedades atractivas a destacar, como su facilidad de modificación, pequeño tamaño (M = 441,4 g/mol), estabilidad, bajo costo y disponibilidad (Reddy y Low, 1998). Sin embargo, también presenta otras propiedades (que no son tan favorables) que es necesario tener en

cuenta durante el manejo de los derivados tipo folato, como son su alta sensibilidad a la luz, su poca solubilidad en agua (10 mg/L a 0°C) y la tendencia de sus conjugados a asociarse mediante enlaces de hidrógeno, formando tetrámeros e incluso octámeros (Reddy y Low, 1998; Na y col., 2004).

El ácido fólico es un ligando fácilmente incorporable a una gran variedad de sustratos a través de sus grupos carboxílicos; una vía de acoplamiento de dicho ligando es la formación de un enlace tipo amida mediante el ataque del grupo amino de un sustrato amino-derivado a través de una sustitución nucleofílica. Este procedimiento requiere de una activación previa de los grupos carboxílicos, generalmente una carbodiimida, como el EDC (hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimida), mediante lo que algunos autores han denominado método EDC (figura 3.11). El uso extendido del activante EDC radica en su buena solubilidad en agua, así como la de su urea correspondiente, lo que facilita el proceso de eliminación de la misma.

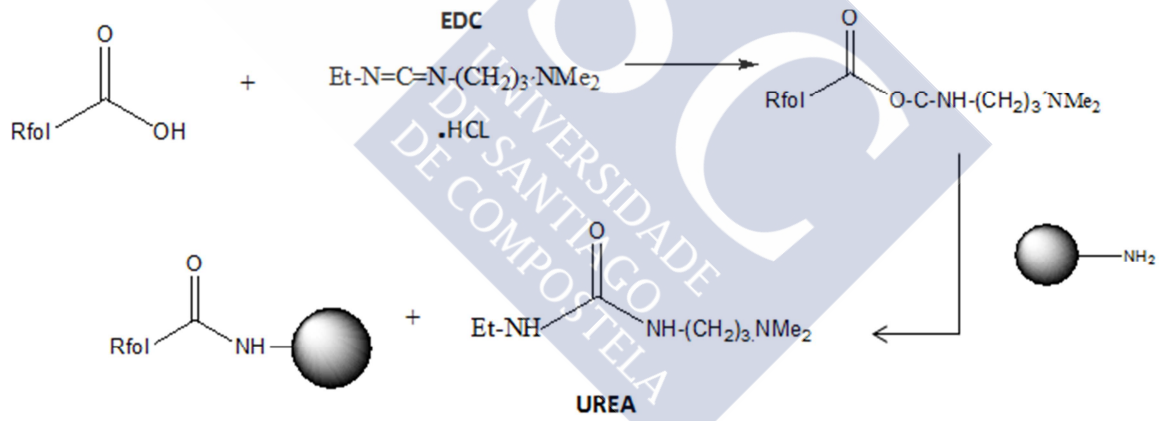


Figura 3.11. Esquema del "Método EDC" para la obtención de conjugados folato

En esta memoria se ha empleado el método EDC para la obtención de conjugados folato a partir de los nanogeles de NIPA-co-DEA. El procedimiento experimental utilizado para la incorporación de la funcionalidad folato, con el método EDC, a los nanohidrogeles sintetizados se describe a continuación.

Materiales

Nanohidrogeles de NIPA-co-DEA (sintetizados en este trabajo y entrecruzados con N,N-metilénbisacrilamida (NMBA)). Ácido fólico (Sigma, 98%), hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3etilcarbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich, ≥ 99%), trietilamina (Merck, ≥ 99%), tampón fosfato salino de Sörensen (PBS), preparado en el laboratorio a partir de una mezcla de 19 ml de una solución de fosfato sódico monobásico monohidratado ($H_2NaO_4.H_2O$) (Sigma-Aldrich 99%) en una concentración de 0.2M y 81 ml de fosfato sódico dibásico dihidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Sigma-Aldrich, 99.5%), igualmente en una concentración 0.2M, aforando en un volumen de 200 ml. El agua utilizada para todos los experimentos fue agua milliQ ®.

Procedimiento

Se preparó una disolución de ácido fólico (2 g, 4,3 mmol en 54 ml) y EDC (0,8 g, 4,3 mmol). Se añadió trietilamina (0,9 g 1,2 ml) gota a gota a la dispersión de ácido y EDC. La mezcla se dejó bajo agitación magnética durante una hora; separadamente, se preparó una dispersión acuosa de nanogeles (1,4 g en 50 ml) y se sometió a agitación magnética constante durante 1 hora para asegurar el completo hinchamiento de la red polimérica y después de este tiempo se le añadió trietilamina (0,2 ml, 1,41 mmol), continuando con la agitación. La disolución de ácido fólico se añadió gota a gota sobre la dispersión de nanogeles y se dejó reaccionar durante 20 horas. El aislamiento y separación del polímero se llevó a cabo por diálisis con tampón fosfato $PO_4^{=}$ (PBS, pH = 7,4), y posteriormente con agua. Todos estos pasos se realizaron en condiciones de ausencia de luz debido a la sensibilidad del ácido fólico a la misma.

3.1.5. Pruebas biológicas.

3.1.5.1. Viabilidad celular con nanopartículas sin fármacos y con fármacos.

Materiales: Para la viabilidad celular sin fármacos se utilizaron nanopartículas sintetizadas en diferentes composiciones de los monómeros y diferentes porcentajes de agentes entrecruzantes (sin cargar con fármacos). Línea celular de *Melanoma B16F10*, obtenida de *American Type Culture Collection* (ATTC). Para la viabilidad celular con fármacos se utilizaron las nanopartículas sintetizadas (muestra M11) cargadas con 5–Fu. Líneas celulares de *melanoma (MEL HO), cáncer de pecho MCF-7), neuroblastoma (SMS-KCNR) y cáncer de colon (HCT-8).*

Procedimiento:

Las células de melanoma B16F10 fueron sembradas en un medio de cultivo que contenía un 5% de SBF (Simulated Body Fluid, o traducido al castellano como Fluido Corporal Simulado). La siembra se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano (figura 3.12) a una densidad de $1{\cdot}10^4$ células/pocillo en 100 µl de medio de cultivo. Una vez terminada la siembra, las células se dejaron reposar durante una noche en estufa para asegurar la adhesión al medio. Posteriormente, el medio fue retirado de cada pocillo y se añadieron 100 µl de una suspensión de nanogeles (con concentración de 1 a 3 mg de nanogeles por cada 5ml del medio dispersante), incubándose después en estufa durante 72 horas.

. La viabilidad celular se determinó a través de un ensayo colorimétrico XTT, realizando las mediciones en un espectrofotómetro de placas (SynergyTM HT, BioTek) a una absorbancia a 490 nm. La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de la viabilidad celular respecto a las células control, como se define en la ecuación 3.1.

$$Viabilidad\ celular = \frac{\text{absorbancia experimental}}{\text{absorbancia control}}\ (100) \qquad (3.1)$$

3.1.5.2. Internalización de los nanogeles en las células tumorales.

Materiales:

Nanopartículas sintetizadas (sin funcionalizar con ácido fólico y cargadas con Coumarin-6) en diferentes composiciones de los monómeros y diferentes porcentajes de agentes entrecruzantes. Línea celular de *Melanoma B16F10*, obtenida de *American Type Culture Collection* (ATTC).

Procedimiento:

Las células de *Melanoma B16F10* fueron sembradas en el medio de cultivo a una densidad $12{,}5x10^4$ células/ml, en placas Petri de 35 mm previamente esterilizadas. Una vez sembradas, las células se incubaron durante una noche en una estufa de CO_2 para asegurar su adhesión al medio de cultivo. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de las placas Petri (quedando las células perfectamente adheridas en la placa) y se añadió sobre las células una suspensión de nanogeles (previamente conjugados con Coumarin-6) con concentración de 1 a 3 mg por cada 5 ml de medio dispersante. Inmediatamente después de haber añadido los nanogeles a las células, se procedió a observar su comportamiento en un microscopio confocal invertido (marca Olympus modelo FV500) (que permite la observación de células vivas) durante un periodo de 60 min. Las imágenes fueron captadas cada 5 min y fueron ensambladas para la realización de un video.

3.2 Técnicas experimentales.

3.2.1. Difusión de luz cuasieléstica (QELS).

La difusión de luz clásica estudia el total de la luz difundida por la muestra con igual frecuencia que la luz incidente, mientras que la difusión de luz dinámica se basa en el estudio de los ensanchamientos de la línea de difusión que se producen por el continuo movimiento de las partículas del medio difusor debido a la agitación térmica. En este tipo de difusión hay que tener en cuenta dos efectos fundamentales:

1. Las partículas en movimiento emiten a diferentes frecuencias debido al efecto Doppler y,

2. El número de moléculas en un determinado volumen difusor fluctúa con el tiempo y, por lo tanto, también lo hace la luz difundida.

El proceso de difusión de luz no es un proceso exactamente elástico, sino más bien quasi-elástico. Por este motivo, la difusión de luz dinámica (DLS) también se conoce como difusión de luz quasielástica (QELS). Por lo tanto, mediante esta técnica es posible obtener información acerca del movimiento molecular. La técnica que normalmente se utiliza en polímeros consiste en determinar la correlación existente entre el número de fotones que llegan al detector en cada instante y los que llegan inmediatamente después. Así, se puede calcular la denominada función de autocorrelación, que da una idea del tiempo dentro del cual existe relación de las intensidades difundidas.

El empleo de la QELS para determinar tamaños de partícula se basa en la medida, por medio de la función de autocorrelación en función del tiempo, de los coeficientes de difusión de las partículas suspendidas. De la función de autocorrelación en función del tiempo se obtiene el coeficiente de difusión, y

suponiendo que es válida la ley de Stokes-Einstein, los tamaños de partículas y las distribuciones de tamaños de partícula.

Debido a la agitación térmica, las moléculas están en continuo movimiento y, por lo tanto, sus posiciones y momentos cambian constantemente con el tiempo, lo que se traduce en una fluctuación de dicha propiedad. La función de autocorrelación de la propiedad A está dada por la ecuación:

$$\langle \mathrm{A}(0)\mathrm{A}(\tau)\rangle = \lim_{T\to\infty}\frac{1}{\mathrm{T}}\int_0^T A(t)\,A(\mathrm{t}+\tau)\,dt \qquad (3.2)$$

En muchos casos, la función de autocorrelación disminuye como una función exponencial simple que se puede expresar como:

$$\langle \mathrm{A}(0)\mathrm{A}(\tau)\rangle = \langle A\rangle^2 + \left\{\langle A^2\rangle - \langle A\rangle^2\right\}\exp\left(\frac{-\tau}{\tau_r}\right) \qquad (3.3)$$

dónde τ_r es el denominado tiempo de relajación, que es el tiempo característico de decaimiento. La forma de la función de autocorrelación es exponencial decreciente, alcanzando el valor de la unidad para tiempos suficientemente largos. La función de autocorrelación de intensidades puede expresarse como:

$$G^{(2)}(\tau) = \lim_{N\to\infty}\frac{1}{N}\sum_{j=1}^{N} n_j n_{j+1} \qquad (3.4)$$

La ecuación anterior se suele normalizar para obtener la función de autocorrelación de intensidad neta:

$$g^{(2)}(\tau) = G^{(2)}(\tau)/G^{(2)}(\infty) = \langle n_i, n_{i+j} \rangle / \langle n \rangle^2 \qquad (3.5)$$

También es posible definir la función de autocorrelación del campo eléctrico, que depende del coeficiente de difusión, de la longitud de onda y del ángulo de medida mediante la expresión:

$$g^{(1)}(\tau) = S(k)\exp(-k^2 D\tau) \qquad (3.6)$$

Por lo tanto, a partir de la función de autocorrelación del campo eléctrico se puede obtener el coeficiente de difusión de las partículas (D). Este coeficiente se puede relacionar a su vez, para partículas esféricas sin interacciones mutuas, con el tamaño hidrodinámico de la partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \qquad (3.7)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad del medio y R_H el tamaño hidrodinámico, que es el tamaño que debería tener una esfera para moverse a la misma velocidad que la partícula que está siendo medida. Para sistemas monodispersos de partículas, la función de autocorrelación de campo eléctrico se expresa como:

$$\left|g^{(1)}(\tau)\right| = \exp(-Dk^2\tau) \qquad (3.8)$$

donde $\Gamma = Dk^2$ y k, el vector de difusión, que se define como:

$$k = \frac{4\pi}{\lambda \operatorname{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right)} \qquad (3.9)$$

Para disoluciones polidispersas, la ecuación anterior se debe generalizar a una suma o distribución de exponenciales:

$$\left|g^{(1)}(\tau)\right| = \int_0^\infty G(\Gamma)\exp(-\Gamma\tau)d\Gamma \qquad (3.10)$$

donde $G(\Gamma)$ es la función de distribución de los tiempos de caída y $G(\Gamma)\,d\Gamma$ es la fracción de la intensidad total difundida por las partículas que obedecen a la relación: $\Gamma = Dk^2$, y que tiene que cumplir además la ecuación:

$$\int_0^\infty G(\Gamma)d\Gamma = 1 \qquad (3.11)$$

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, la determinación del tamaño de partícula por medio del uso de la técnica de difusión de luz cuasielástica consiste en:

a) Medida de la función de autocorrelación,

b) Ajuste de la función medida para determinar el valor de Γ,
c) Cálculo del coeficiente de difusión a partir de la expresión $\Gamma = Dk^2$ para un ángulo de observación determinado y,
d) Determinación del radio hidrodinámico para una temperatura y viscosidad indicadas.

La dificultad experimental reside en medir la función de autocorrelación de la forma más exacta posible. Esto supone ajustar la escala de tiempo del correlador de modo que el decaimiento en la función de autocorrelación a tiempos de caída más cortos sea sensible a las partículas presentes más pequeñas, que los tiempos de caída más largos se ajusten de modo que la función de autocorrelación sea sensible a las partículas más grandes y, por último, que las medidas sean lo más largas posibles para mejorar la estadística de conteo de fotones.

Existen diferentes métodos que permiten el tratamiento de los datos adquiridos, dentro de los cuales encontramos:

1. MÉTODO DE CUMULANTES. Este método se emplea más habitualmente para distribuciones de tamaños estrechas,

2. MÉTODO NNLS (*Non Negative constrained Least Squares*). Se utiliza para funciones de distribución multimodales, es decir, con varios tamaños de partícula. Este método emplea un criterio de mínimos cuadrados para evaluar cada iteración, permitiendo únicamente contribuciones positivas a la distribución de intensidades y garantiza la convergencia en un número finito de iteraciones con un mínimo error. Con este método se obtiene información de la posición de los picos y de la relación entre sus áreas.

3. MÉTODO CONTIN. Se utiliza para funciones de distribución multimodales; este método parte de una solución preliminar no normalizada en un intervalo de log Γ equidistantes, y a partir de ahí emplea un proceso de normalización que sigue criterios estadísticos. Cabe destacar que este método requiere una elevada relación señal-ruido.

3.2.1.1. Instrumentación QELS.

El equipo empleado es un fotogoniodifusómetro digital Brookhaven, BI-9000AT de 522 canales, que permite tomar medidas cada 0,025 μs, equipado con un láser de ión-Argón con refrigeración de agua que opera con fuente de luz a 514,5 nm y con una potencia de 100 mW. Las células de medida son cilíndricas, con camino óptico de 20 mm. La célula de medida está inmersa en una cuba con un disolvente de índice de refracción igual o parecido al del vidrio (n = 1,460-1,660). Este disolvente debe estar perfectamente filtrado, con el fin de eliminar las partículas de polvo que contenga. En este caso se ha empleado n-xileno (n = 1,495-1,499).

El sistema de detección óptico consiste en lentes de transmisión, una rendija, un filtro óptico de banda estrecha para reducir la luz ambiente, y otra ranura ajustable. La señal originada por este sistema se amplifica y luego se discrimina con el fin de producir un tren de pulsos uniforme que contienen toda la información acerca de la luz difundida y que son almacenados en los diferentes canales de un correlador.

Esta operación se realiza varias veces, acumulando las funciones de autocorrelación hasta obtener la final, con una buena relación señal-ruido. La figura 3.13 muestra una fotografía del equipo empleado para este análisis.

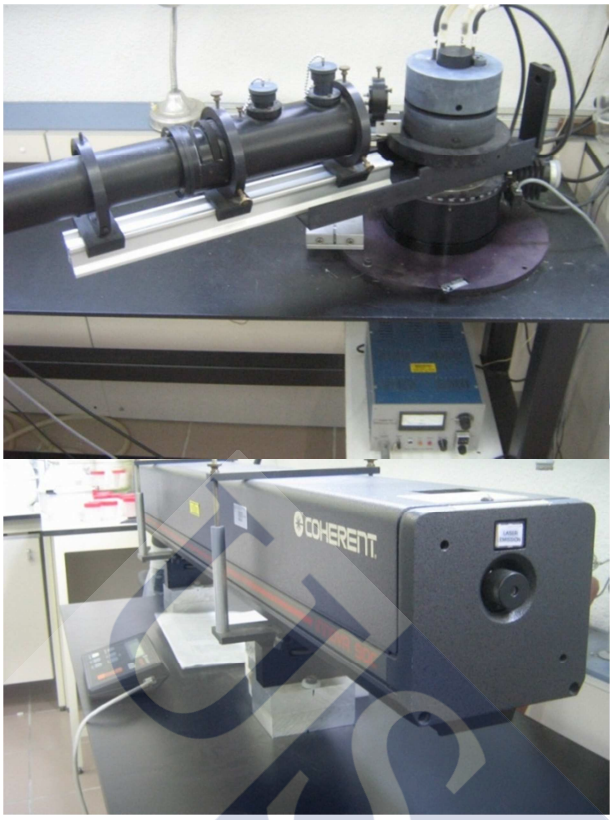


Figura 3.13. Equipo de difusión de luz cuasielástica Brookhaven BI-9000AT.

3.2.1.2. Preparación de la muestra y medida.

La distribución de tamaños de partícula se realizó a un ángulo de 90º y se ha analizó por el método CONTIN; sin embargo, se realizó simultáneamente el análisis por el método NNLS mostrando valores relativamente similares. Todas las muestras fueron dispersadas en agua desionizada y en soluciones tampón a diferentes pH (Panreac), previamente filtradas, en concentraciones entre 1-3 mg/5 mL en ambos casos. En todos los casos, las muestras dispersas se mantuvieron en agitación magnética constante durante 4 días antes de realizar las mediciones.

3.2.2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

De una manera general, la espectroscopia infrarroja se fundamenta en la absorción de la radiación IR por parte de las moléculas. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula pasa a un estado vibracional excitado gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión implican cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En la figura 3.14 muestran los diferentes tipos de vibraciones moleculares que podemos encontrar.

En moléculas poliatómicas, el espectro IR consiste en una serie de bandas, relativamente anchas, debidas a los modos normales de vibración de la molécula. Pueden aparecer bandas fundamentales y sobretonos, e incluso bandas de combinación de los diferentes modos normales de la molécula. Sin embargo, en la zona del espectro electromagnético IR con números de onda comprendidas entre 1.300 y 400 cm^{-1}, la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales combinadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.). En esta región espectral, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

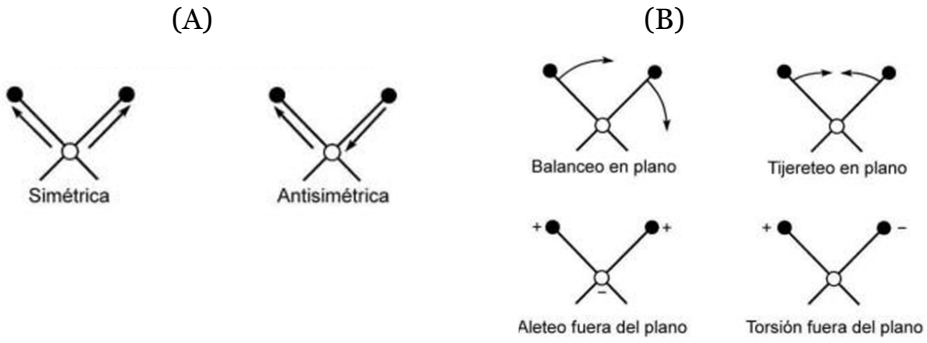


Figura 3.14. Diferentes vibraciones encontradas en la región infrarroja. (A) Vibraciones de tensión y (B)Vibraciones de flexión.

En el caso de los polímeros, la asignación de vibraciones características de enlaces o grupos es posible porque no hay acoplamientos importantes con el resto de la molécula, de forma que tiene importantes aplicaciones en la caracterización e identificación de polímeros. Pero, si los hay, dichos acoplamientos nos pueden dar información acerca del entorno molecular del grupo, pudiéndose emplear para el estudio de conformaciones o de estructuras cristalinas. Igualmente, la espectroscopia infrarroja se ha empleado en el estudio de las cinéticas de los procesos de polimerización midiendo la evolución con el tiempo de alguna banda característica de absorción de los monómeros o del polímero implicado en el proceso.

La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de medición de los espectros infrarrojos que en lugar de registrar la cantidad de radiación absorbida por la muestra cuando se hace incidir sobre ella luz infrarroja de distintas frecuencias (seleccionada por medio de un monocromador), utiliza radiación infrarroja policromática que se guía a través de un interferómetro y se hace pasar a través de la muestra, de esta manera la señal que se obtiene es un interferograma. El uso de la expresión matemática de la transformada de Fourier (ecuación 3.14) sobre el interferograma (*f(t)*), permite transformar esta señal en un espectro idéntico (*F(v)*) al que se obtendría por un método convencional (dispersivo) de espectroscopia infrarroja.

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i2\pi\nu t} dt \qquad (3.12)$$

Los espectrómetros FTIR son más baratos que los convencionales, porque la construcción de espectrómetros con interferómetros es más fácil que la fabricación de un monocromador. Además, el tiempo de registro de un único espectro es notablemente inferior para la técnica de FTIR, porque la información en todas las frecuencias se recoge de manera simultánea. Esto permite trabajar promediando la señal obtenida sobre un número elevado de espectros registrados sobre una misma muestra, consiguiéndose así una notable mejora en la sensibilidad y calidad del espectro final. Debido a sus diversas ventajas, casi todos los espectrómetros infrarrojos modernos trabajan bajo de diseño FTIR.

3.2.2.1. Instrumentación FTIR.

Para la obtención de los espectros FTIR se empleó un espectrofotómetro FTIR *Nicolet* modelo 6700 equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) *Smart Orbit*. Todos los espectros se obtuvieron a partir de un promedio de cien barridos, con una resolución de 4 cm^{-1}. La figura 3.15 muestra una fotografía del equipo empleado para estas mediciones.



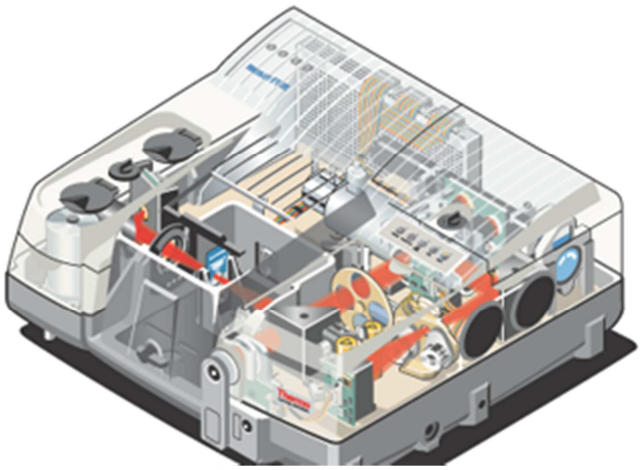


Figura 3.15. Arriba) Fotografía del equipo FTIR Nicolet 6700 y abajo) Diagrama operacional interno del FTIR Nicolet 6700.

3.2.2.2. Preparación de la muestra y medida.

El procedimiento experimental para la obtención de los espectros fue el siguiente (figura 3.16):

1. Se colocó una pequeña cantidad de muestra sobre el disco de diamante del accesorio Smart Orbit (normalmente entre 10-30 mg),
2. Se introdujo una punta de presión al accesorio ATR, cuya geometría se seleccionó en función del material de contacto a analizar,
3. Se giró el tornillo de presión hasta lograr un buen contacto con el disco de diamante y,
4. Finalmente se recolectó el espectro por medio del software instalado en el ordenador del equipo. Los espectros obtenidos fueron de al menos un promedio de 100 barrido con una resolución de 4 cm^{-1}.

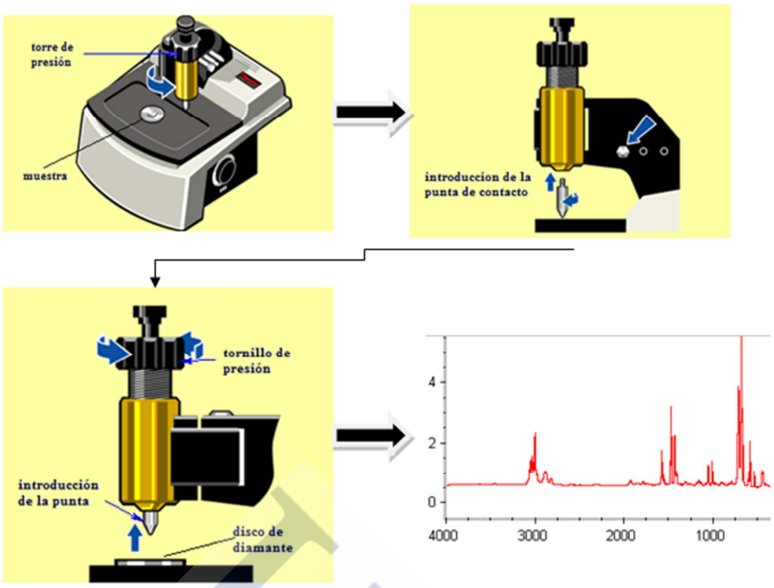


Figura 3.16. Secuencia experimental para la obtención de espectros FTIR en el equipo Nicolet 6700.

3.2.3. Espectroscopia UV-Visible.

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación electromagnética por una molécula en esta zona del espectro, lo que provoca el tránsito de un electrón de su capa de valencia de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia específica, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. La longitud de onda (λ) en esta región del espectro electromagnético está comprendida entre los 190 y 800 nm. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV.

En absorción UV-Visible, pueden observarse las distintas transiciones electrónicas:

Transiciones σ→σ (λ < 150 nm)*. Este tipo de transiciones se dan sobre todo en compuestos que únicamente poseen enlaces σ (por ejemplo, C-H o C-C). La

energía requerida para que tenga lugar esta transición es relativamente grande, perteneciente a la región espectral denominada ultravioleta de vacío.

Transiciones n→σ (λ entre 150-200 nm)*. Correspondientes a compuestos que poseen átomos con pares de electrones no compartidos (electrones no enlazantes). La energía necesaria para que se produzca esta transición sigue siendo alta (aunque menor que en las σ → σ*) perteneciendo éstas a la región espectral del UV lejano.

Transiciones n→π y π→π* (λ entre 200-700 nm)*. La mayoría de las aplicaciones de espectroscopia UV-visible se basan en transiciones que ocurren en esta zona. Se requiere que las especies participantes aporten un sistema de electrones π (grupos cromóforos: compuestos con insaturaciones, sistemas aromáticos multicíclicos, etc.). Las energías de excitación en las transiciones π →π* son medianamente altas, correspondiendo a la región UV lejano y próximo, mientras que las n → π* son considerablemente menores, correspondiendo a la región visible del espectro.

El empleo cuantitativo de los equipos de espectroscopia UV-visible radica en el uso de la ecuación de Lambert-Beer, también conocida como ley de Beer o ley de Beer-Lambert-Bouguer, que nos dice que la atenuación de la intensidad de un haz de luz cuando atraviesa un material absorbente, es proporcional a la longitud del camino óptico recorrido en el medio y a la concentración de partículas absorbentes en el mismo.

Este comportamiento puede expresarse de distintas maneras, empleando las siguientes ecuaciones:

$$A = \alpha l c \qquad (3.13)$$

$$\frac{I}{I_o} = 10^{-\alpha l c} \tag{3.14}$$

$$A = -\log \frac{I}{I_o} \tag{3.15}$$

$$\alpha = \frac{4\pi k}{\lambda} \tag{3.16}$$

en donde A es la absorbancia, I_o es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz una vez que ha atravesado el medio, l es la distancia que recorre la luz en el cuerpo absorbente, c es la concentración de sustancia absorbente en el medio, α es el coeficiente de absorción de la sustancia, λ es la longitud de onda del haz de luz incidente y k es el coeficiente de extinción molar de la muestra en estudio.

3.2.3.1. Instrumentación UV-visible.

Tanto las medidas de espectros UV-visible requeridos, como las medidas de las cinéticas de liberación, se hicieron empleando un espectrofotómetro Cintra modelo 303 de doble haz, suministrado por GBC Instruments. Se acopló al instrumento una bomba peristáltica de flujo con una termocelda de control de temperatura, con el fin de realizar las lecturas con un flujo constante a una temperatura específica. La figura 3.17 muestra una fotografía del espectrofotómetro Cintra 303 empleado para estos análisis.

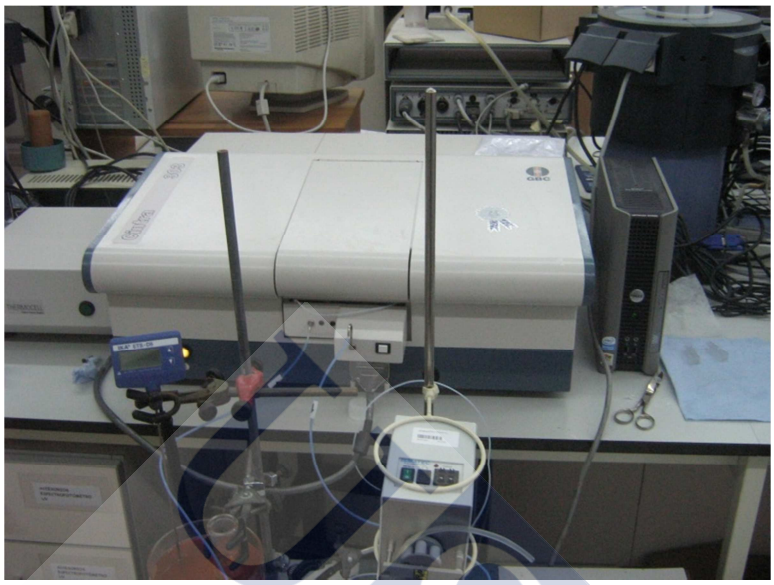


Figura 3.17. Espectrofotómetro Cintra 303 de GBC Instruments.

3.2.3.2. Preparación de la muestra y medida.

En todos los casos, las mediciones de los espectros UV se llevaron a cabo con disoluciones de concentraciones suficientemente diluidas como para satisfacer las condiciones de la ley de Beer. En el caso de los nanogeles y los monómeros sintetizados fue necesario una purificación previa con éter dietílico y un periodo de 2 horas para secar las muestras. Para las lecturas de los fármacos no fue necesaria purificación previa.

El procedimiento experimental para la obtención de los espectros fue el siguiente:

1. Inicialmente, el equipo se calibró sin ninguna cubeta para realizar un background del aire; calibración que permitirá eliminar las posibles interferencias producidas por éste.

2. Una vez realizado el background, se realizó un barrido de línea base empleando dos cubetas de cuarzo, ambas con el mismo disolvente empleado para el análisis espectroscópico.

3. Se retiró la cubeta frontal del equipo (figura 3.18) que pertenece a la muestra y se introdujo en ella una disolución de concentración conocida (en ppm) de la muestra a analizar se procedió a realizar un barrido de longitudes de onda a una velocidad de 1000 nm/minuto, con una apertura de rendija de 1,5 nm y un tiempo de integración de 0,025 segundos, en cada caso.

4. El espectro fue guardado para análisis posteriores.

En el caso de las medidas de cinéticas de liberación de los fármacos, el procedimiento experimental seguido fue el siguiente:

1.- El equipo se calibró sin ninguna cubeta para realizar un background del aire; calibración que al igual que en el caso anterior permitirá eliminar las posibles interferencias producidas por éste,

2.- Se acopló al equipo el dispositivo regulador de flujo (en este caso la bomba peristáltica con la termocelda de control de temperatura), y se procedió a llenar la celda de flujo con PBS pH = 4; del mismo modo se llenó la cubeta de referencia de cuarzo con el mismo PBS, con el fin de realizar un calibrado de línea base adecuado.

3.- Se seleccionó en el equipo la opción “time scan” en la cual se le indicó al software que midiera a la longitud de absorción máxima para cada uno de los fármacos, (determinada mediante el paso anterior) y se calibró el equipo a un valor de cero.

4.- Una vez realizada la calibración a cero, se puso en funcionamiento la bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 15 rpm.

5.- Se acondicionó un baño termostatizado externo a 37ºC para realizar la liberación. La bomba peristáltica posee dos conductos (entrada y salida) que permiten introducir y expulsar la muestra a leer por la celda de flujo. Se introdujo el conducto de entrada en el medio de liberación externo y se realizaron las medidas de liberación en función del tiempo.

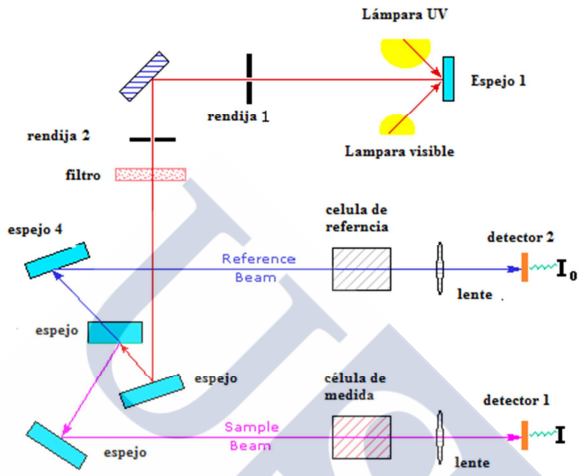


Figura 3.18. Diagrama operacional del espectrofotómetro Cintra 303.

3.2.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Las propiedades fundamentales de un protón son su masa, su carga y su espín o momento angular. El movimiento de giro del protón actúa de forma similar a la de una corriente circular, generando un campo magnético. Si un núcleo dado está formado por p protones y n neutrones, su masa total será igual a la suma de las masas de los protones y neutrones. Su carga valdrá +p y su espín total será el vector resultante de los vectores de los espines de los protones y neutrones del núcleo, valiendo cada uno de ellos, en valor absoluto, 1/2. El núcleo más simple que se conoce es el del átomo de hidrógeno que consta de sólo un protón y tiene un espín 1/2.

Sin embargo, el deuterio, que es un isótopo del átomo de hidrógeno, tiene dos protones y un neutrón. Esto hace que el espín del deuterio pueda valer 0 ó 1,

según que los espines sean opuestos o paralelos (experimentalmente se ha determinado que adopta el valor 1, como puede verse en la Tabla 12.7) Las siguientes reglas son útiles para determinar el valor del espín de un átomo:

1) Los núcleos con p y n par tienen espín cero (por ejemplo, ^{4}He, ^{12}C, ^{16}O, etc),

2) Los núcleos con masa impar tienen espines semienteros (por ejemplo, ^{1}H, ^{11}B, ^{13}C, ^{15}N, ^{17}O, ^{93}F, ^{13}P, etc).

3) Los núcleos con p y n impar tienen espín entero (por ejemplo, ^{4}He, ^{12}C, ^{16}O, etc).

Si el espín nuclear es nulo, no es posible emplear la RMN como técnica de caracterización. Un núcleo con espín I puede adoptar 2I + 1 orientaciones diferentes cuando están sometidos a un campo magnético. El número de espín I, como hemos visto antes, puede adoptar valores enteros o semienteros, positivos o negativos, como se muestra en la figura 3.19. Cada átomo tiene su número de espín característico. Para el carbono y el oxígeno el espín es nulo, lo que es una suerte en el caso de los compuestos orgánicos, pues no aparecen estos átomos en el espectro.

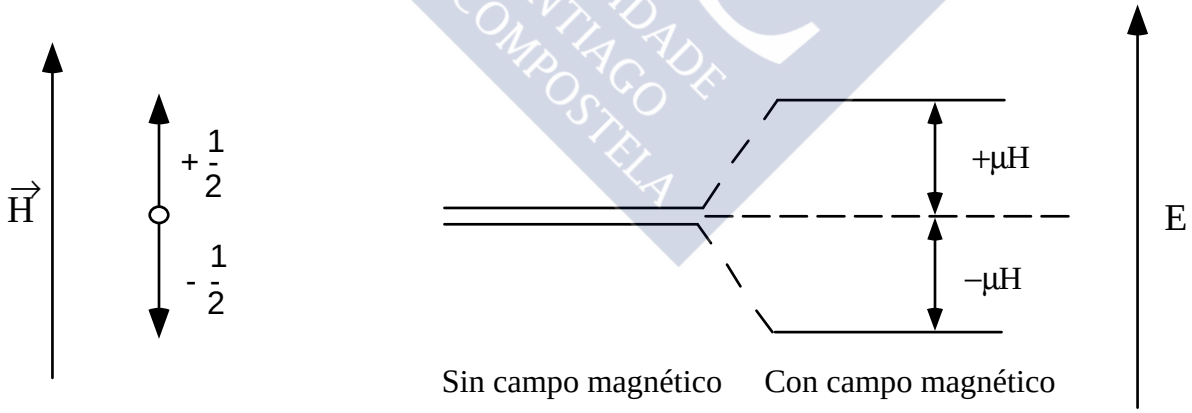


Figura 3.19. Niveles de energía de espín nuclear de un núcleo de espín 1/2 (por ejemplo, ^{1}H ó ^{13}C) en presencia y ausencia de un campo magnético.

Una de las principales preocupaciones en RMN es la de mejorar apreciablemente las relaciones señal/ruido de los instrumentos, pues no debemos olvidar la pequeña magnitud que tienen los fenómenos de interés, tales como el desplazamiento químico y, sobre todo, los acoplamientos espín-espín. La técnica denominada de promedio temporal permite, por acumulación de espectros, mejorar la relación señal/ruido de los mismos. Sin embargo, esta técnica requiere repetir un gran número de veces el espectro completo, e irlo acumulando punto a punto, lo que implica un enorme gasto de tiempo si queremos mejorar notablemente su espectro.

La ventaja de la técnica es que en un tiempo de aproximadamente 1 segundo se puede recoger el espectro de desexcitación originado después del pulso de radiofrequencia, que contiene todo el espectro, y almacenarlo en un ordenador. De esta forma, en el tiempo habitual en que se tarda en registrar un espectro completo con los aparatos RMN habituales, que es del orden de 500 segundos, el método de transformada de Fourier permite acumular del orden de 500 espectros, con la consiguiente mejora de la relación señal/ruido. Encargándose finalmente el ordenador de aplicar la transformación de Fourier sobre el espectro de desexcitación observado en función del tiempo, y promediado (unas 500 veces, o las que nosotros queramos) en el espectro habitual en función de la frecuencia.

El espectrómetro con transformada de Fourier es bastante parecido a los espectrofotómetros RMN convencionales, salvo por el hecho de que ahora el campo magnético suele ser constante, y tanto el oscilador de radiofrequencia como el detector, deben ser de "banda ancha", en vez de sintonizado a una frecuencia determinada. El equipo requiere un ordenador para almacenar y convertir los datos, y para controlar la anchura de las pulsaciones y los intervalos de recolección de datos.

Cuando sometemos una muestra a un "pulso" de radiación, es decir sometamos a la muestra a una radiación electromagnética polarizada de frecuencia discreta ν, conectándola y desconectándola muy rápidamente. De forma que si ha

sido τ el tiempo que ha durado el pulso el intervalo de frecuencias que percibe la muestra es ν +Δν, con:

$$\Delta\nu \approx \frac{1}{2\pi\tau} \qquad (3.17)$$

La radiación electromagnética somete a la muestra a un campo magnético B_1. Bajo la influencia de este campo magnético estacionario, el vector magnetización comienza a precesar alrededor de su dirección (hacia el eje y´) con una velocidad que es proporcional a B_1, su frecuencia de precesión viene dada por: $\omega = \gamma B_1$ (rad/s), siendo γ la relación giromagnética del núcleo. Si el pulso dura un tiempo τ, el ángulo θ que habrá girado el vector M por la acción de B_1 viene dado por:

$$\theta = \frac{360}{2\pi}\gamma B_1 \tau \qquad (3.18)$$

Una vez que el pulso ha concluido, el sistema tiende a volver a su situación original, de forma que el vector magnetización retrocede al eje z con una constante de tiempos T_2 (típicamente T_2 tiene valores cercanos al segundo), proceso que detecta la bobina de observación registrando la componente y de la magnetización. Esta componente varía con el tiempo de acuerdo con la expresión:

$$M_y(t) = M_o \cos(2\pi\nu_L t) e^{-t/T_2} \qquad (3.19)$$

la forma de esta señal (puede verse en la figura) es la de una amortiguación oscilatoria, o como se le conoce habitualmente de amortiguación libremente

inducida o FID (del inglés *Free-Induction Decay*). De esta forma, si S(t) es la señal en el dominio del tiempo (la curva FID total) puede expresarse como una integral extendida a todas las frecuencias que contribuyen a la misma:

$$S(t) = \int_{-\infty}^{\infty} I(\nu) e^{-2i\pi\nu t} d\nu \qquad (3.20)$$

En esta expresión I(ν) es el espectro en el dominio de las frecuencias, el espectro clásico de RMN. Pues bien, puede demostrarse que esta señal de desexcitación en función del tiempo no es otra cosa que la transformada de Fourier del espectro, y que, por lo tanto, nos va a permitir, siguiendo este proceso, remontarnos matemáticamente al espectro. De forma que I(ν) se obtiene evaluando la integral:

$$I(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) e^{-2i\pi\nu t} dt \qquad (3.21)$$

Los espectros RMN del ^{13}C dan información precisa sobre el esqueleto de los compuestos orgánicos. Sin embargo, la baja abundancia isotópica (1,1%) y el muy pequeño momento dipolar magnético del ^{13}C hacen que su espectro sea prácticamente imposible de estudiar con un espectrómetro convencional. Sin embargo, la resonancia magnética nuclear mediante transformada de Fourier con su facilidad para aumentar la relación señal/ruido de estos espectros mediante acumulación y promediado, hace que los estudios del ^{13}C de abundancia natural sean relativamente fáciles de hacer.

La figura 3.20 muestra un esquema del funcionamiento operacional de un espectrofotómetro de RMN.

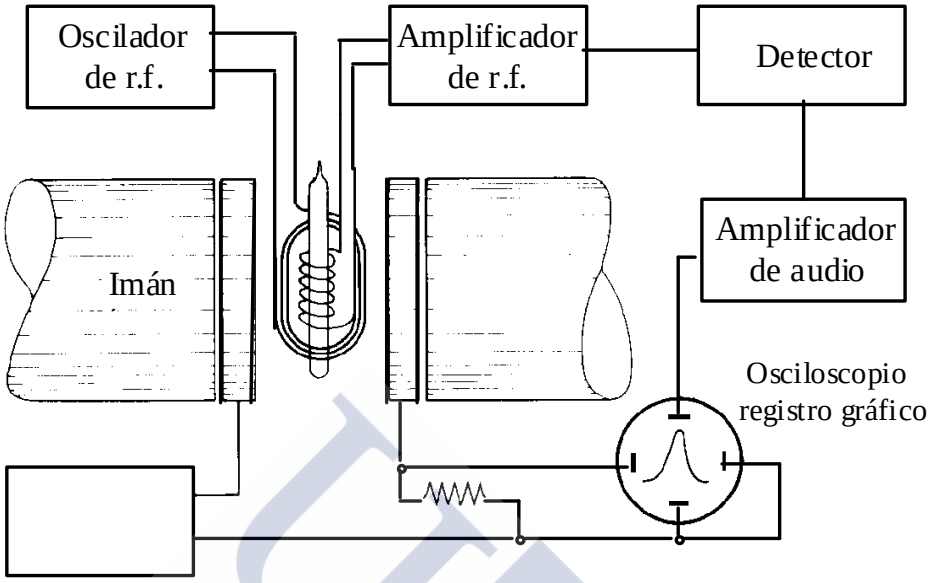


Figura 3.20. Diagrama operacional de un espectrofotómetro de RMN.

3.2.4.1. Instrumentación RMN.

Los espectros de resonancia magnética nuclear tanto de protón (RMN ^{1}H) como de carbono (RMN ^{13}C), se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Bruker Avance de 500 MHz con un ordenador de control Silicon Graphics O_2 en la modalidad de pulsos con transformada de Fourier. La figura 3.21 muestra una fotografía del equipo utilizado.



Figura 3.21. Fotografía de un espectrofotómetro de RMN.

3.2.4.2. Preparación de la muestra y medida.

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical.

El campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación de radiofrecuencia excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias, los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín).

A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a la frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN).

Las muestras para realizar los espectros de RMN ^1H se han preparado por dispersión de los nanogeles según el caso, en cloroformo deuterado ($CDCl_3$), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d6*), y agua deuterada (D_2O). Los desplazamientos químicos (δ) se han medido en ppm, en relación al cloroformo (δ = 7,26), DMSO-d_6 (δ = 2,49) y agua deuterada (δ = 4,80).

3.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry* o DSC) es una técnica termo-analítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia se mide en función de la temperatura.

La muestra y la referencia se mantienen aproximadamente a la misma temperatura a través de un experimento. Generalmente, el programa de temperatura para un análisis DSC se diseña de tal modo que la temperatura del crisol portador de la muestra aumenta linealmente en función del tiempo. El crisol de referencia debe tener una capacidad calorífica bien definida en el intervalo de temperaturas en que vaya a tener lugar el barrido.

El principio básico de esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física, tal como una transición de fase, se necesitará suministrar más o menos calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura.

El que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico o endotérmico. El resultado de un experimento DSC es una curva de flujo calorífico frente a la temperatura o el tiempo.

El flujo de calor a una temperatura dada nos proporciona mucha información. Este flujo de calor (*Fc*) esta expresado en unidades de calor suministrado q por unidad de tiempo t (ecuación 3.22). La velocidad de calentamiento (K_h) es el incremento de temperatura T por unidad de tiempo t (ecuación 3.23).

$$Fc = \frac{q}{t} \tag{3.22}$$

$$K_h = \frac{\Delta T}{t} \tag{3.23}$$

Cuando suministramos una cierta cantidad de calor a una muestra su temperatura se incrementará en una cierta cantidad. La cantidad de calor necesaria para producir ese determinado incremento es llamado capacidad calorífica o simplemente C_p. Si dividimos el flujo de calor q/t por la velocidad de calentamiento

T/t, tendremos calor suministrado dividido por el incremento de temperatura (ecuación 3.24).

$$\frac{\frac{q}{t}}{\frac{\Delta T}{t}} = \frac{q}{\Delta T} = C_p \qquad (3.24)$$

Existen dos convenciones diferentes al representar los efectos térmicos: las reacciones exotérmicas que exhibe la muestra pueden mostrarse como picos positivos o negativos, dependiendo del tipo de tecnología o de instrumentación utilizadas en la realización del experimento. Los efectos sobre o bajo una curva DSC pueden utilizarse para calcular entalpías de transiciones. Este cálculo se realiza integrando el pico correspondiente a una transición dada. Así, la entalpía de la transición puede expresarse por la siguiente ecuación:

$$\Delta H = kA \qquad (3.25)$$

donde ΔH es la entalpía de la transición, *K* es la constante calorimétrica y A es el área bajo la curva. La constante calorimétrica variará de instrumento a instrumento, y se determina mediante un calibrado, analizando una sustancia de alta pureza con entalpías de transición perfectamente conocidas.

La representación del flujo de calor en función de la temperatura o del tiempo, constituye la curva de DSC, que recibe el nombre de curva calorimétrica (figura 3.22).

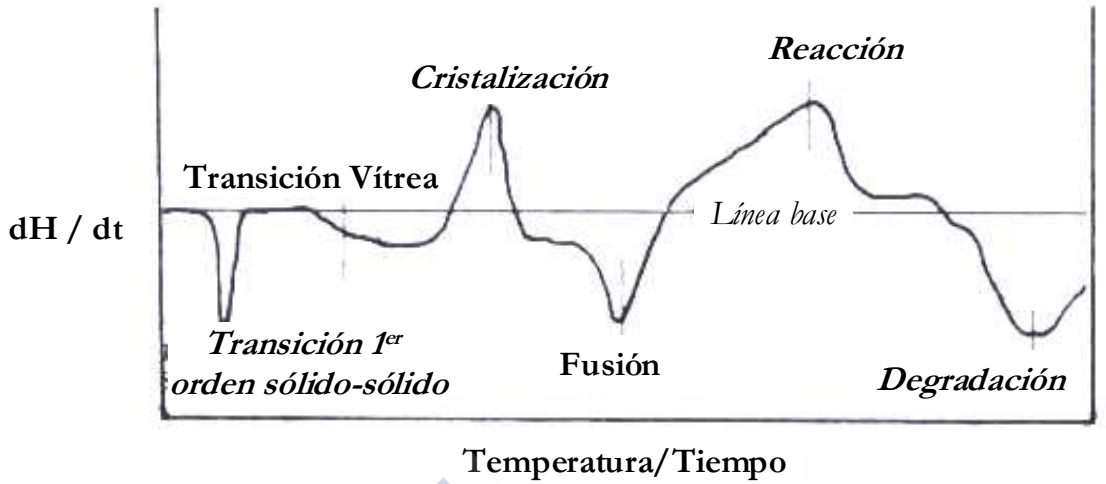


Figura 3.22. Curva calorimétrica en la que se aprecian las transiciones más relevantes obtenidas por calorimetría diferencial de barrido.

Las transiciones de primer orden (fusión) dan picos estrechos. Las transiciones físicas en polímeros corresponden a picos más anchos que las transiciones similares en moléculas de bajo peso molecular. La transición vítrea (pseudo-transición de segundo orden), supone un cambio brusco en la línea base. La muestra absorbe calor debido a una mayor capacidad calorífica. Las reacciones químicas como polimerización, curado, oxidación, entrecruzamiento, dan picos anchos.

La información obtenida de una curva calorimétrica sirve para identificar los compuestos y el tipo de transformación que sufren. Cada compuesto en iguales condiciones tiene su propia y única curva calorimétrica que aporta una descripción térmica del mismo.

La transición vítrea es una transición cuya naturaleza esta bajo controversia, que se manifiesta en todos los polímeros, pero con mayor claridad en los polímeros amorfos; es decir, polímeros cuyas cadenas no están dispuestas en un ordenamiento cristalino, si no que están esparcidas sin ningún orden, aún en estado sólido.

Incluso los polímeros semicristalinos tienen alguna cierta cantidad de dominios amorfos. Esto explica porque una misma muestra de un polímero puede tener tanto una temperatura de transición vítrea como una temperatura de fusión. Aunque es evidente que la porción amorfa solo experimentará la transición vítrea, y la porción cristalina sólo la fusión.

Cuando la temperatura es alta, las cadenas pueden moverse con facilidad. De manera que si se toma una muestra de polímero y se dobla, las moléculas, que ya están en movimiento, no tendrán problemas en moverse hacia nuevas posiciones, a fin de aliviar la tensión que se está ejerciendo sobre ellas. La T_g puede definirse de varias formas:

Umbral (onset): Como la temperatura a la que se inicia la variación en la línea base,

Punto medio (midpoint): Temperatura correspondiente a la mitad del incremento en el calor específico durante la transición.

Criterio de punto de inflexión de la curva (inflection point): Temperatura correspondiente al punto de inflexión del salto.

Estos criterios en la asignación de la temperatura de transición vítrea pueden observarse con mayor claridad en la figura 3.23.

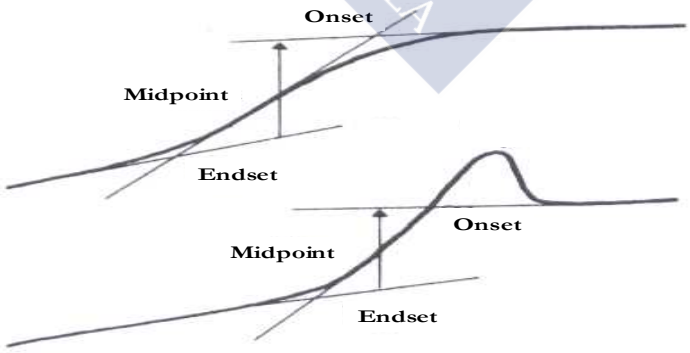


Figura 3.23. Criterios en la asignación de la temperatura de transición vítrea.

3.2.5.1. Instrumentación DSC.

Para medir la temperatura de transición vítrea (T_g), de los nanogeles se utilizó un calorímetro diferencial de barrido TA Instruments (DSC 2920). La célula de análisis permite realizar medidas entre -170 y 450ºC, con una precisión de $\pm$ 0,2ºC. Para el enfriamiento de la muestra se emplea un tanque de refrigeración acondicionado para uso de nitrógeno líquido. El flujo de calor se calibra comparando el área de la curva de fusión experimental del Indio con la entalpía de fusión del Indio, perfectamente conocida (28,45 J/g). Este método permite también un calibrado sencillo de la temperatura, comparando la temperatura de fusión experimental del Indio con la tabulada (156,6ºC).

3.2.5.2. Preparación de la muestra y medida.

Para obtener mediciones más precisas el equipo fue previamente calibrado con estándares de indio (156,68ºC) y de zafiro para calibrar el valor de la constante de celda del equipo. El análisis térmico se realizó de -20 a 250ºC, a una velocidad de calentamiento de 10 grados/minuto y con un flujo de nitrógeno de 100 mL•min^{-1}. La cantidad de muestra empleada en todos los casos fue de 10 $\pm$ 4 mg. Se utilizó el criterio del punto medio para asignar la T_g de todas las muestras. Todos los termogramas obtenidos se repitieron 3 veces consecutivas bajo las mismas condiciones de análisis.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo discutiremos los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta memoria. Primeramente, se discute la síntesis de las nanopartículas de NIPA–co–DEA por medio de la polimerización en microemulsión, caracterizando posteriormente sus propiedades más importantes, incluidas el pH y la termo-sensibilidad, características cruciales en la aplicación práctica de nuestras nanopartículas. En la segunda sección se aborda el tema de la síntesis y caracterización de las nanopartículas de NIPA–co–DEA sintetizadas por un segundo método de polimerización, la nanoprecipitación. Estudiaremos las propiedades más importantes así como evaluaremos las ventajas y desventajas de ambos métodos de polimerización. En la tercera sección, se estudian las propiedades de encapsulación y liberación de los distintos fármacos seleccionados para el desarrollo de esta memoria (5–Fu, la metformina y la terfenadina), así como también se estudiarán los efectos que trae consigo el variar la cantidad de agente entrecruzante y de la composición monomérica. En el cuarto apartado, se describen las técnicas utilizadas para la obtención de las nanopartículas con el ligando ácido fólico, para poder ser endocitadas por los diferentes tipos de células. Por último, se realizarán diferentes tipos de pruebas biológicas, en las cual se comprobará o descartará la posible aplicación de nuestras nanopartículas como transportadores de fármacos para el tratamiento contra el cáncer.

4.1. Síntesis y caracterización de nanogeles de NIPA–co–DEA.

Durante las últimas décadas la síntesis de nanopartículas poliméricas con propiedades termo y pH–sensibles ha ido en aumento, ya que muchos grupos de investigación alrededor del mundo han enfocado sus trabajos sobre este tema.

Se han estudiado diversos tipos de materiales con aplicaciones en biomedicina, principalmente como materiales liberadores de fármacos. Por lo que a esto respecta, los hidrogeles (micro/nanogeles) presentan grandes ventajas respecto a otros materiales, ya que su red tridimensional les permite almacenar grandes contenidos de agua, así como también fármacos, y además presentar propiedades de biocompatibilidad *(Pérez et al., 2009; Zhang et al., 2006; Jung et al., 2000 y Raemdonck et al., 2009)*.

Como hemos mencionado en el capítulo 2, la elección del método de polimerización de los nanogeles dependerá de diversos factores, tales como el diámetro hidrodinámico (tamaño) y la distribución de tamaño de las partículas, el área de aplicación y otros *(Prasad Rao y Geckeler, 2011)*.

Para que nuestros nanogeles puedan ser utilizados como materiales potencialmente aplicables en biomedicina, éstos deben de cumplir ciertas condiciones:

En su estructura molecular deben participar al menos dos monómeros. En este estudio hemos elegido dos que son la NIPA y el DEA. Con ellos hemos podido sintetizar copolímeros de P(NIPA–co–DEA) con diferentes composiciones. La elección del sistema estuvo basada en las diferentes propiedades de cada uno de los dos monómeros. En este sentido, se optó por la NIPA, entre otras cosas, por tratarse de un monómero ampliamente estudiado en el mundo de los hidrogeles, por sus propiedades termosensibles y por los buenos resultados de biocompatibilidad que sus derivados han mostrado hasta ahora. El comonómero DEA, a su vez, se eligió por sus propiedades de hinchamiento al variar el pH del medio.

Por otra parte, considerando que las aplicaciones para las cuales han sido sintetizados estos materiales son para ser inyectados por vía intravenosa como dispositivos de transporte y liberadores de fármacos, fue necesario precisar que el diámetro de las nanopartículas no debe sobrepasar un determinado valor con el fin de evitar efectos secundarios, como por ejemplo trombosis. Por esta razón, el método de síntesis seleccionado fue la polimerización en microemulsión, ya que es

una técnica que nos permite el control del diámetro hidrodinámico de las partículas en el intervalo de los nanómetros, con una distribución de tamaños muy estrecha, muy cercana a la unidad (1,2 ± 0,1). Sin embargo, este método presenta la desventaja de requerir grandes cantidades de agentes tensioactivos para la estabilización del sistema, lo que hace necesario realizar una limpieza cuidadosa del material obtenido, lo cual genera el empleo de un mayor número de operaciones unitarias y un gasto más elevado en su preparación.

Por esta razón, se eligió un segundo método de síntesis, la polimerización en nanoprecipitación, que es un método rápido, sencillo y ventajoso, pues no precisa de sustancias estabilizadoras tipo tensioactivos tan difíciles de eliminar.

En esta Memoria, hemos también realizado un estudio comparativo sobre las ventajas y desventajas que presentan ambos sistemas, tanto en la obtención del material como en las propiedades químico–físicas para su utilización como biomateriales liberadores de fármacos.

4.2. Nanogeles sintetizados por microemulsión.

La síntesis en microemulsión se basa en la restricción del volumen de reacción al tamaño coloidal de sus micelas, ya que éstas actúan como nanoreactores, evitando así la macrogelificación y posibilitando la obtención de nanogeles. El tamaño de las partículas obtenidas mediante la microemulsión es bastante pequeño, pudiendo obtenerse nanogeles esféricos monodispersos de diámetro inferior a 50 nm *(Nie et al., 2005; Zhao et al., 2006, Guerrero–Ramírez et al.*, 2008), lo que permite explicar la transparencia óptica de las microemulsiones, como ya se ha explicado en apartados anteriores.

Para ello, se trabaja con altas concentraciones de tensioactivos (aniónicos, catiónicos, etc.). En algunos casos es necesario el uso de un co–tensoactivo, como un alcohol, que se intercala entre las moléculas de los tensoactivos en la interfase para favorecer el proceso de micelización *(Corkhill et al., 1987).*

4.2.1. Muestras sintetizadas.

Como se ha mencionado anteriormente, la microemulsión fue estabilizada empleando un sistema de tensioactivo y co–tensioactivo (*sección 3.1.1*). Los estabilizadores elegidos fueron el hexaoleato de sorbitol polietoxilado (ATLAS G–1086) como tensioactivo y el sesquioleato de sorbitan (ARLACEL 83) como co–tensioactivo, cuyos valores de HLB son 10,2 y 3,7, respectivamente.

En el estudio realizado por el grupo de investigación de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular de la Universidad del País Vasco (*Guerrero-Ramírez*, Tesis doctoral, *2009*) se encontró que el valor de HLB total del sistema que mostró los mejores resultados en la estabilidad de la microemulsión fue igual a 9,5 (correspondiente a un 25% del total de la microemulsión de agentes tensioactivos); por lo cual optamos por utilizar esta composición en la síntesis de los nanogeles.

En la tabla 4.1 se muestran los valores de las composiciones utilizadas para nuestro sistema.

Tabla 4.1. Formulaciones iniciales de las fases que componen la microemulsión, donde FA = fase acuosa, FO = fase orgánica y ST = sistema tensioactivo.

FORMULACIÓN INICIAL			
HLB	***FA (%)***	***FO (%)***	***ST (%)***
9.5	58	17	25

Es importante comentar que la fase acuosa se compuso de la mezcla de agua y monómeros (el agua correspondió a un 80% del total de la fase y los monómeros un 20% del total), mientras que la fase orgánica se refiere a la isoparafina sintética hidrocarbonada (ISOPAR M) y el sistema tensioactivo se compuso de la mezcla de los tensioactivos mencionados anteriormente.

Las fases de la tabla 4.1 se mantuvieron constantes para cada uno de los

polímeros obtenidos, sin embargo, la composición de alimentación de los monómeros, el agente entrecruzante y una sal añadida para la disminución del diámetro hidrodinámico de la partícula se variaron, con objeto de obtener diferentes propiedades en los copolímeros y determinar la composición que tuviera el mejor efecto para las posteriores aplicaciones que requeriríamos.

En la tabla 4.2 se muestran las composiciones exactas de cada componente para cada muestra sintetizada, así como su codificación, que se empleará a lo largo de su caracterización mediante diferentes técnicas analíticas que se irán discutiendo a lo largo de este capítulo.

Tabla 4.2. Identificación y formulaciones de síntesis para las muestras de NIPA–co–DEA sintetizadas.

	FASE ACUOSA			**FASE ORGANICA**	**SISTEMA TENSIOACTIVO**		**AGENTE ENTRECRUZANTE**	
		MONÓMEROS						
Código	***Agua (g)***	***NIPA (%)***	***DEA (%)***	***ISOPAR M (g)***	***ATLAS g***	***ARLACEL g***	***NMBA (%)***	***SAL (%)***
M1	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M2	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	7 *	5 *
M3	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	10 *	5 *
M4	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	3 *	5 *
M5	46,4	50	50	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M6	46,4	60	40	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M7	46,4	40	60	17,0	22,5	2,25	5 *	0
M8	46,4	30	70	17,0	22,5	2,25	5 *	0
M9	46,4	20	80	17,0	22,5	2,25	5 *	0
M10	46,4	10	90	17,0	22,5	2,25	5 *	0
M11	46,4	10	90	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M12	46,4	20	80	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M13	46,4	30	70	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M14	46,4	40	60	17,0	22,5	2,25	5 *	5 *
M15	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	5 *	3 *
M16	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	5 *	1 *
M17	46,4	95	5	17,0	22,5	2,25	5*	8 *

*Porcentaje calculado en base a la cantidad de monómeros totales en el sistema

Para la codificación de las muestras sintetizadas se eligió como prefijo la

letra M, haciendo referencia a que todas estas muestras se obtuvieron por el método de síntesis de polimerización en microemulsión.

También es importante mencionar que la composición de monómeros en la tabla, está dada en porcentaje de uno respecto al otro, haciendo notar que como comentamos anteriormente, los monómeros representan el 20 del 56% que representa la fase acuosa (11,6 g de monómeros).

4.2.2. Cinética de polimerización.

Dos de las consideraciones más importantes en el proceso de síntesis de un polímero son, i) que el tiempo de reacción no sea excesivamente largo para minimizar los costos, y ii) que el rendimiento de la reacción (conversión de monómero a polímero) sea lo más alto posible.

Se siguió la cinética de polimerización por un método gravimétrico para conocer el porcentaje de conversión de los monómeros a polímero, así como también para conocer el tiempo en que la reacción alcanza el máximo rendimiento.

La reacción de polimerización para este sistema es relativamente rápida, ya que, al agregar el iniciador al sistema, se produce un aumento de temperatura de 25 a 42°C. Una vez que se ha alcanzado esta temperatura, el valor comienza a decaer hasta llegar de nuevo a su valor inicial de 25°C. El tiempo total de reacción para este sistema en particular, se ha estimado que tiene un valor promedio de 5 minutos. En la figura 4.1 puede observarse que tiempos de reacción superiores a los 5 minutos no suponen un cambio significativo en el porcentaje de conversión.

Los cálculos de rendimiento se obtuvieron empleando la ecuación 4.1.

$$\% \text{ rendimiento} = 100 \cdot \frac{W_\alpha}{W_\beta} \qquad (4.1)$$

donde W_α es el peso en gramos del polímero purificado y seco (xerogel), y W_β el

peso en gramos de monómeros totales en la formulación de la microemulsión.

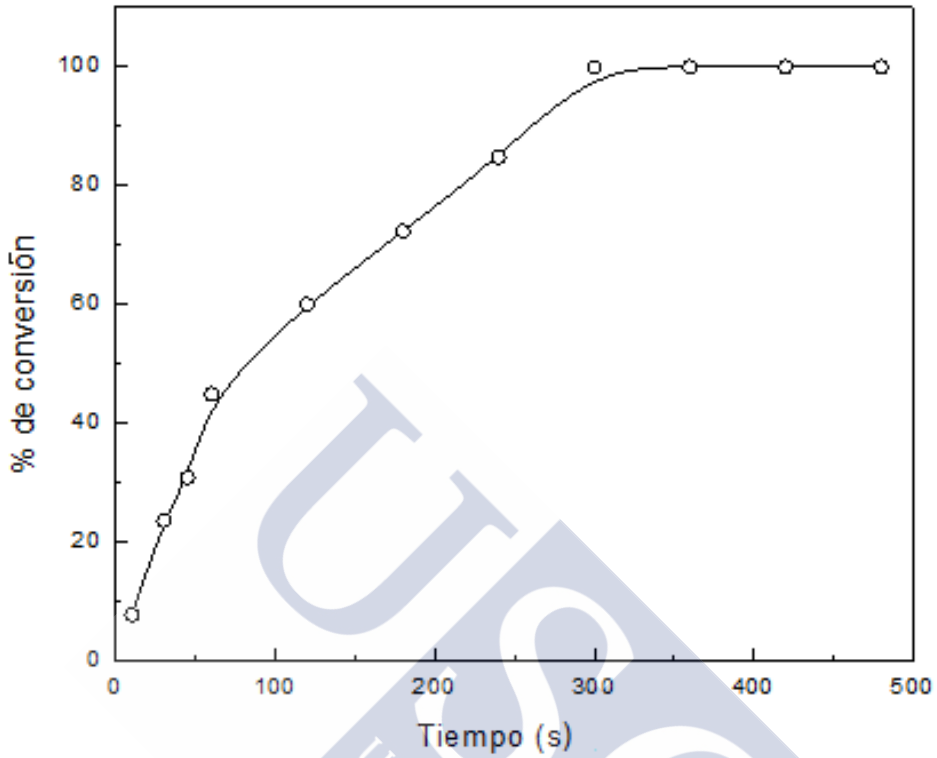


Figura 4.1. Cinética de copolimerización obtenida para la muestra M1 empleando un método gravimétrico.

Los valores de rendimiento fueron similares para todas las muestras sintetizadas, todas ellas por encima del 95% de conversión.

En la tabla 4.3 se presentan los porcentajes de conversión calculados por un método gravimétrico para cada una de las muestras sintetizadas.

Con los resultados obtenidos de la conversión en función del tiempo de reacción, podemos asegurar la viabilidad de la síntesis los nanogeles. Hay que señalar que, en nuestro caso, los porcentajes de conversión son muy altos y los tiempos de reacción muy pequeños.

Tabla 4.3. Porcentajes de rendimiento calculados para las muestras de NIPA–co–DEA.

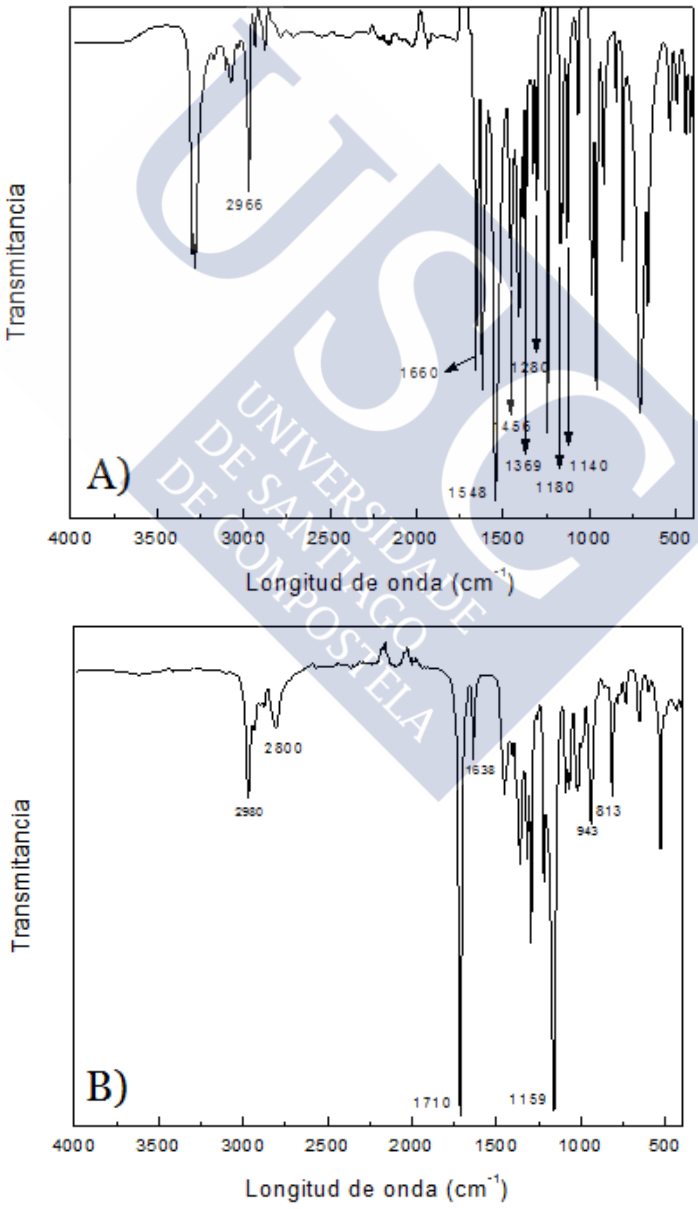
Código de muestra	% de conversión
M1	99,9
M2	99,7
M3	99,9
M4	99,9
M5	97,9
M6	99,9
M7	99,9
M8	99,9
M9	98,5
M10	99,9
M11	97,4
M12	99,6
M13	99,9
M14	99,9
M15	96,9
M16	99,7
M17	99,6

4.2.3. Caracterización mediante FTIR.

La técnica de espectroscopia infrarroja con trasformada de Fourier nos permitió realizar un análisis cualitativo de nuestros nanogeles. Primeramente, obtuvimos los espectros de los monómeros en estado puro y posteriormente el del copolímero de poli(NIPA–co–DEA). Con estos espectros validamos la incorporación de ambos monómeros en la estructura del copolímero.

La figura 4.2 muestra los espectros FTIR del monómero NIPA (A), el monómero DEA (B) y del nanogel de poli(NIPA–co–DEA) (C), en donde se muestran las bandas características más importantes en su estructura química. En el espectro de la NIPA (A) se pueden observar las bandas características correspondientes a este monómero como, por ejemplo, las vibraciones de tensión del grupo amida monosustituida (1.660, 1.648, 1.470, y 1.280 cm^{-1}) y también

encontramos las vibraciones del grupo isopropílico (2.966, 1.395, 1.369, 1.340, 1.180, y 1.140 cm^{-1}). Por su parte, en el espectro del monómero DEA aparecen las bandas características de las vibraciones del enlace C–N a 810 y 1.159 cm^{-1}; las vibraciones de 2.800 cm^{-1} que pertenecen a los estiramientos C–H de la amina terciaria, y la banda más característica de este monómero se encuentra a 1.730 cm^{-1} y que corresponde al pico de absorción correspondiente al grupo carbonilo de tipo éster (*Zhang et al., 2007*). Mientras tanto, en el espectro del copolímero (C), se observan las bandas más importantes de ambos monómeros.



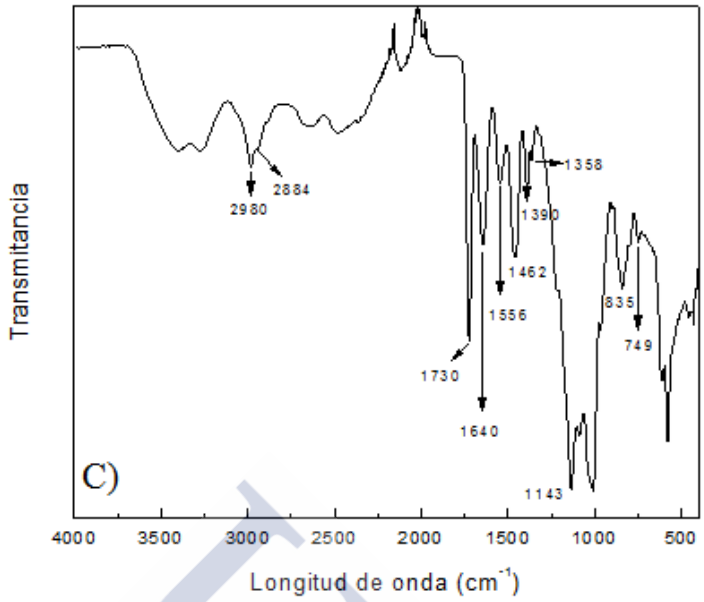


Figura 4.2. Espectros infrarrojos de la NIPA (A), DEA (B) y del nanogel del copolímero de NIPA–co–DEA (C).

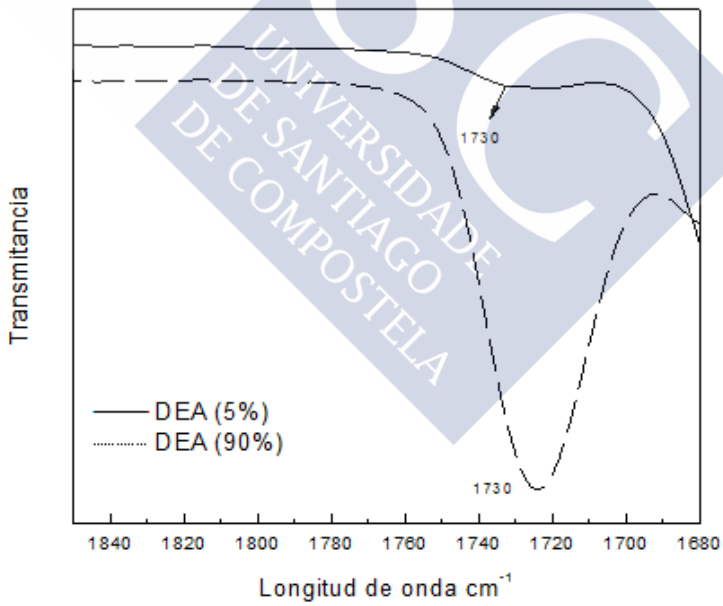


Figura 4.3. *Espectros infrarrojos de los nanogeles, incorporación del monómero DEA a la estructura polimérica.*

En la figura 4.3 se muestran los espectros FTIR ampliados en la zona de 1.840 a 1.680 cm^{-1} de dos de los nanogeles sintetizados, se presentan la muestra

M1 (que contiene un 5% de DEA) y la muestra M11 (que contiene un 90% de DEA), en donde es fácilmente apreciable la diferencia en la intensidad de la banda que aparece a 1.730 cm^{-1} (correspondiente al carbonilo de tipo éster del monómero DEA) y que nos permite asegurar la correcta incorporación de dicho monómero en los nanogeles obtenidos.

4.2.4. Cinética de eliminación de los tensioactivos en los nanogeles mediante FTIR.

Como ya se ha comentado anteriormente, la característica principal de las microemulsiones es, que la cantidad de tensioactivo que se requiere para la estabilización de estos sistemas es al menos un 10% de la masa total del sistema. Esta concentración de agentes tensioactivos deberán ser eliminados completamente para que el material pueda ser utilizado posteriormente. Si las aplicaciones del material están enfocadas al área de la biomedicina entonces se requerirá un mayor cuidado.

Debido a que nuestros materiales han sido diseñados para ser utilizados como dispositivos liberadores de fármacos en células cancerígenas, se ha tenido un especial cuidado en la remoción de los agentes tensioactivos, por lo que se ha seguido la cinética de limpieza del material por espectroscopia FTIR.

En el capítulo 3.1.1 de la sección experimental, se describió que se efectuaron cinco lavados con éter etílico para la limpieza de los nanogeles, y después de cada lavado, se realizó un espectro FTIR a la muestra, y así pudimos observar la eliminación de los agentes tensioactivos en la muestra después de cada lavado.

En la figura 4.4 se muestran las estructuras moleculares de los agentes tensioactivos y en la figura 4.5 los espectros infrarrojo de ambas moléculas, en donde se puede observar que existe una banda característica para ambos agentes, esta banda aparece a una longitud de onda de 1.730 cm^{-1}, que corresponde a las vibraciones de los enlaces carbonilos de tipo éster de ambas moléculas.

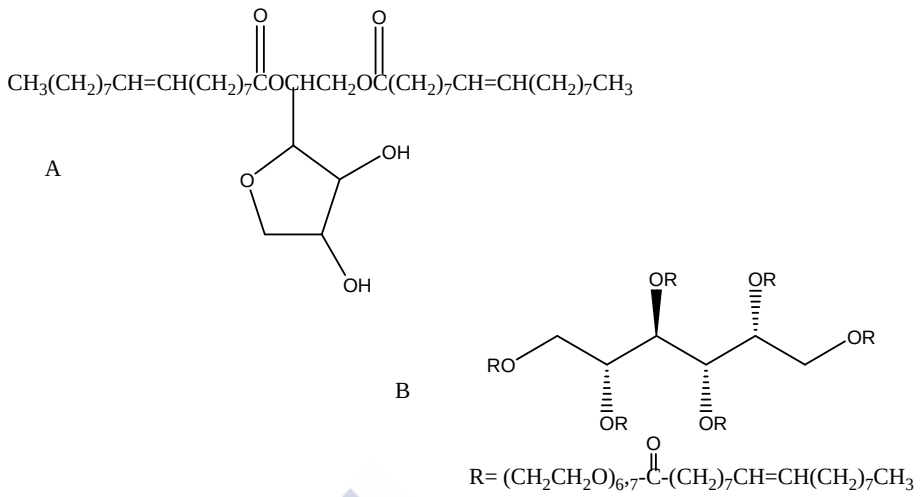


Figura 4.4. Estructuras químicas de los agentes tensioactivos estabilizadores de la microemulsión, arlacel 83 (A) y atlas G1086 (B).

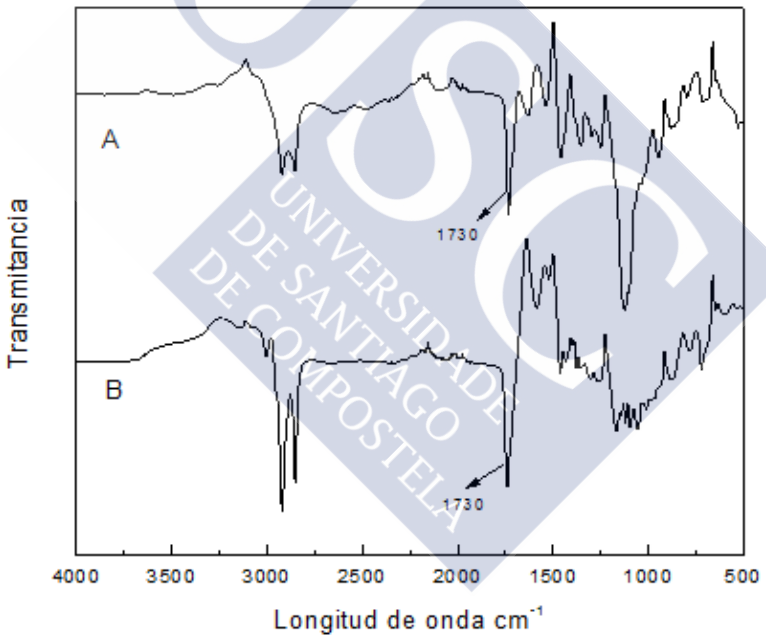


Figura 4.5. Espectros FTIR de los agentes tensioactivos, arlacel 83 (A) y atlas G1086 (B).

Una vez localizada una banda que nos permitiera seguir la cinética de limpieza de los materiales, se obtuvieron los 5 espectros de cada muestra después de cada lavado. En la figura 4.6 se muestran estos espectros FTIR para el nanogel

M1 (después de los lavados antes mencionados). Se eligió ésta muestra debido a que el monómero DEA presenta una banda de absorción del carbonilo tipo éster a la misma longitud de onda (1.730 cm^{-1}) y una muestra con mayor concentración de dicho monómero podría interferir en la absorción de la banda y no permitirnos ver con exactitud el número de lavados precisos para obtener una muestra libre de agentes tensioactivos.

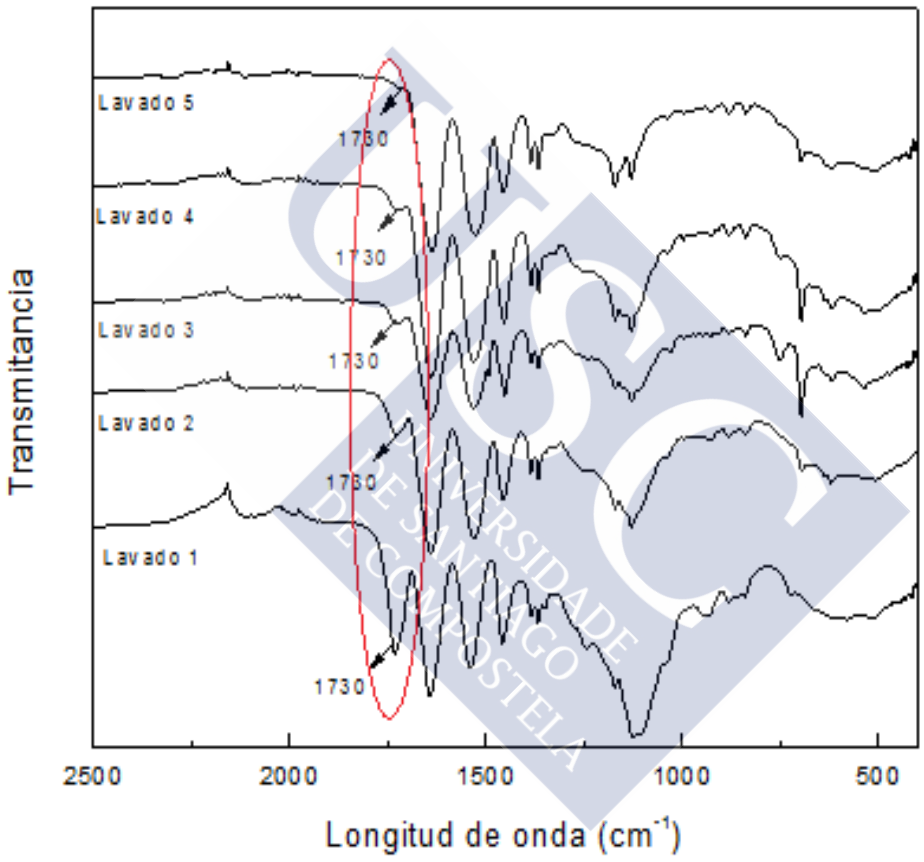


Figura 4.6. Espectros FTIR de la muestra M1 después de cada lavado con éter etílico.

Esta misma figura (4.6) nos muestra una clara disminución de la intensidad de la banda de absorción a 1.730 cm^{-1} a partir de un segundo lavado a la muestra. Sin embargo, para una completa desaparición de la banda (tomando en cuenta que no desaparecerá por completo, ya que el comonómero DEA absorbe a esa misma

longitud) se han requerido un mínimo de cinco lavados para la obtención de una muestra libre de agentes tensioactivos. Al cabo de esos lavados la banda correspondiente al grupo carbonilo se mantiene constante, independientemente del número de lavados que se efectúen.

4.2.5. Caracterización mediante RMN de protón.

La técnica de RMN ^{1}H no ha sido muy empleada en la caracterización de copolímeros debido a que la anchura y el solapamiento de las señales normalmente impiden la integración de las mismas. Sin embargo, en el caso de los nanogeles de P(NIPA–co–DEA), ambos comonómeros presentan algún protón que resuena en una zona del espectro separada de las señales correspondientes al esqueleto hidrocarbonado, lo que posibilita la integración de la misma y por lo tanto el cálculo de la relación molar real entre los comonómeros.

La composición de los copolímeros sintetizados se determinó así, mediante resonancia magnética nuclear de protón. Para realizar los espectros, las muestras se prepararon dispersando los nanogeles en dimetilsulfóxido deuterado (C_2D_6OS).

Los espectros obtenidos muestran que los nanogeles contienen en su estructura tanto el monómero NIPA como el monómero DEA, lo que nos corrobora la información obtenida mediante FTIR y nos confirma una correcta copolimerización, debido a que encontramos señales a desplazamientos químicos correspondientes para ambos monómeros. En la figura 4.7 se muestra el espectro correspondiente a la muestra M11 (NIPA 10:90 DEA), en la que podemos ver claramente la presencia de las señales antes mencionadas. Espectros similares se han obtenido para todas las muestras.

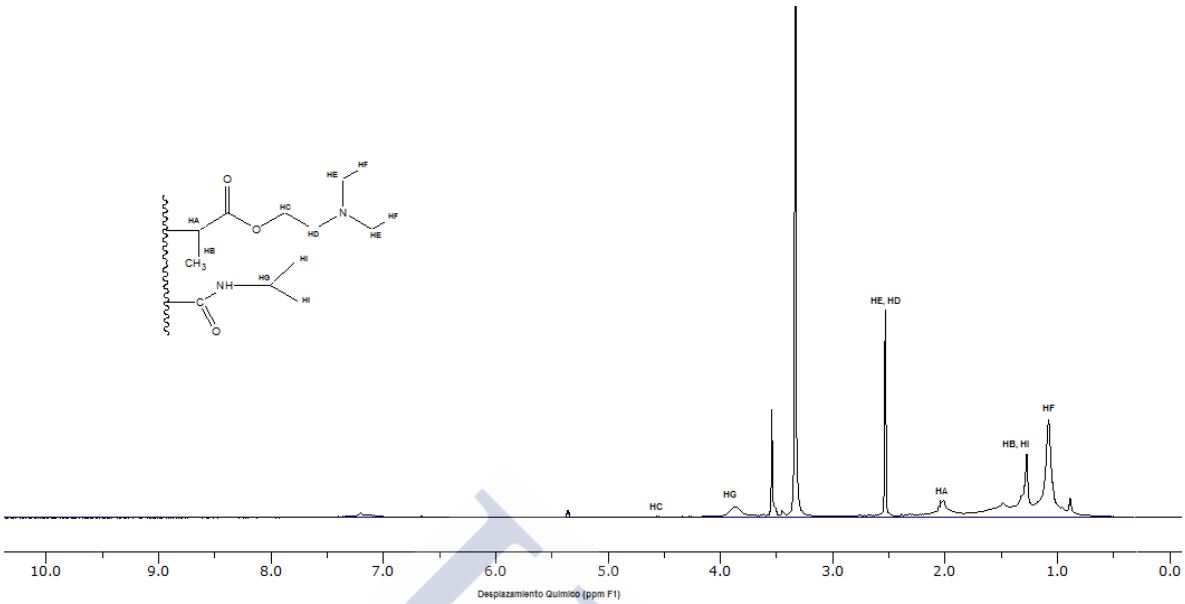


Figura 4.7. Espectro RMN de protón de la muestra M11.

Al integrar estos picos se obtuvieron valores que nos indicaron la cantidad de protones de cada monómero presentes en el sistema, de tal manera que podemos obtener de forma cuantitativa la composición molar real de cada muestra de nanogeles sintetizada empleando la siguiente ecuación:

$$F_1 = \frac{\frac{I_\alpha}{x}}{\frac{I_\alpha}{x} + \frac{I_\beta}{y}} \qquad (4.2)$$

Donde "x" es el número total de protones isopropilo en el monómero DEA, "y" es el número total de protones isopropílicos de la NIPA, "I_α" la integral correspondiente a los protones isopropilos del DEA e "I_β" la integral correspondiente a los protones isopropílicos de la NIPA. La tabla 4.4 recoge las composiciones de NIPA y DEA obtenidas por esta técnica.

Tabla 4.4. Composición de los nanogeles NIPA–DEA sintetizados, determinada por RMN.

Código de muestra	%mol NIPA	%mol DEA
M1	94,3	5,7
M2	95,4	4,6
M3	94,8	5,2
M4	96,1	3,9
M11	8,7	91,3
M12	19,2	80,8
M13	31,6	68,4
M14	37,8	62,2

4.2.6. Caracterización térmica mediante DSC.

Las macromoléculas en estado amorfo presentan un sinfín de conformaciones desordenadas para cada cadena flexible, que se encuentran separadas por barreras de energía de rotación interna. Cuando la temperatura es lo suficientemente elevada, las macromoléculas pasan rápidamente de una conformación a otra, pero si la temperatura desciende progresivamente, el cambio conformacional se hace cada vez menos frecuente y las cadenas pierden su flexibilidad. En este enfriamiento se llega a alcanzar una temperatura característica de cada polímero, que se denomina temperatura de transición vítrea, T_g. Por debajo de esta temperatura el polímero carece de movilidad molecular y su aspecto es el de un sólido rígido. A temperaturas superiores a la T_g, el aspecto del polímero es muy distinto mostrándose deformable debido a la flexibilidad parcial de las cadenas (*Horta, 1994*).

La T_g puede ser considerada como un parámetro más de caracterización, y con este objetivo se determinaron las temperaturas de transición vítrea (T_g) de los nanogeles sintetizados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). El seguimiento de la T_g por DSC se caracteriza por la aparición de un cambio abrupto en el calor específico en la región de la transición, que se transforma un cambio de línea base en la curva calorimétrica.

En la figura 4.8 se muestran las curvas calorimétricas de dos muestras de

nanogeles sintetizadas con diferentes composiciones, habiendo obtenido curvas calorimétricas similares para todos los nanogeles. En la imagen A se muestra el nanogel M1, el cual tiene un 95–5% de NIPA–DEA en su estructura, mientras que en la imagen B se muestra el nanogel M13 que contiene un 30–70% de NIPA–DEA. En esta figura puede observarse que la disminución de la línea base del flujo de calor comienza a descender a bajas temperaturas (línea punteada) con respecto a otros polímeros, esto se debe a que la transición vítrea que presenta el homopolímero del monómero DEA es relativamente baja (≈ 16°C) (*Tobolsky y Shen, 1963; Cornejo–Bravo y Siegel, 1996),* sin embargo, este descenso se desplaza hacia temperaturas menores cuando la composición de DEA en las nanopartículas aumenta.

La tabla 4.5 muestra las temperaturas de transición vítrea obtenidas para los nanogeles copoliméricos sintetizados con diferente porcentaje de NIPA y DEA e igual grado de entrecruzamiento (5% NMBA respecto al monómero total). Como se puede observar, se han obtenido valores de la T_g para los nanogeles copoliméricos intermedios entre los valores de T_g de los correspondientes nanogeles homopolímeros. En un copolímero, las cadenas están constituidas por dos eslabones con dos estructuras químicas distintas, en este caso, la de la NIPA y la del DEA, a las que corresponden dos valores distintos de T_g (DEA ≈ 16°C y NIPA ≈ 104°C). Si el copolímero está constituido por bloques, cada bloque tiene su propia T_g y en la curva calorimétrica pueden observarse ambas transiciones vítreas. Si el copolímero no es por bloques, sino que presenta una distribución al azar o alternada, tiene una única transición vítrea, que es intermedia entre la de los dos homopolímeros. Este es el caso de los nanogeles de P(NIPA–co–DEA), que sólo presentaron un valor de T_g, que según fue la composición del copolímero, estuvo más próximo al valor de la de uno de los homopolímeros o de la del otro, como se muestra en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Temperatura de transición vítrea de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA) entrecruzados con NMBA (5%) en función del porcentaje de los monómeros.

Muestra	NIPA (%)	DEA (%)	T_g (°C)
M1	95	5	62,8 ± 0,2
M11	10	90	60,9 ± 0,2
M12	20	80	58,8 ± 0,1
M13	30	70	57,3 ± 0,3
M14	40	60	55,1 ± 0,2

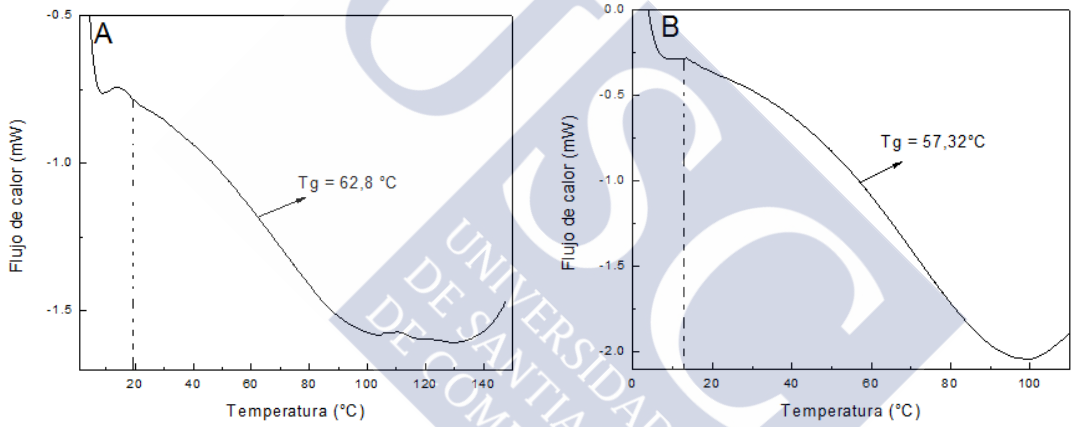


Figura 4.8. Termogramas correspondientes a la región de la transición vítrea en las muestras de nanogeles NIPA–DEA sintetizadas con diferentes composiciones. (A) M1 y (B) M13.

4.2.7. Tamaño de partícula por microscopía *TEM.*

Mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión TEM, hemos podido comprobar que, empleando la polimerización en microemulsión, podemos obtener geles con diámetros nanométricos.

Esta técnica ha permitido confirmar que las nanopartículas presentan una forma esférica, aunque también se ha podido observar la presencia de un cierto efecto de agrupamiento y/o aplastamiento o deformación, ocasionado durante la

preparación de la muestra y que depende de la naturaleza de los nanogeles. Esta condición de esfericidad, que pudo ser claramente comprobada, es clave para la posterior caracterización de los nanogeles mediante difusión de luz (QELS), ya que en el tratamiento de datos de esta técnica, se asume que las partículas en suspensión tienen forma esférica.

Gracias a la capacidad de aumento del microscopio TEM, se pudieron obtener micrografías (figura 4.9) claras y de contornos de partículas perfectamente definidos. Tal y como se observa en la figura 4.9, se trata de una distribución de tamaños de partícula con cierta polidispersidad, pero con un diámetro de partícula intermedio predominante. Micrografías similares se obtuvieron para todas las muestras de nanogeles sintetizadas.

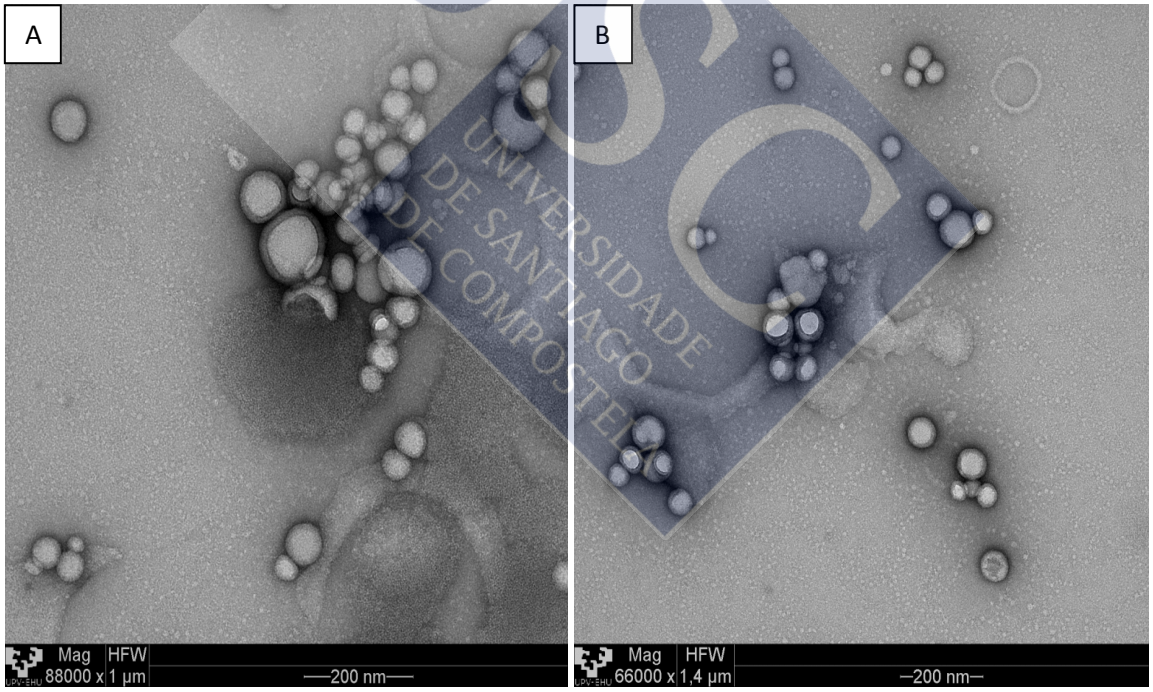


Figura 4.9. Micrografía TEM de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA). Muestra M1 (A) y muestra M11 (B).

4.2.8. Tamaño de partícula por difusión de luz (QELS).

La difusión de luz QELS, permite la determinación de forma rápida y sencilla de los diámetros hidrodinámicos de partículas de nanogeles dispersados, sin ningún tratamiento previo de los mismos. De forma que ofrece información cuantitativa de las dimensiones hidrodinámicas de las partículas en su estado hinchado, evitando los problemas de enmascaramiento del verdadero diámetro de partícula que puede entrañar la microscopía electrónica. Por este motivo, el QELS fue la técnica empleada para la determinación cuantitativa del diámetro hidrodinámico de las partículas de los microgeles sintetizados. Para ello, las muestras se dispersaron en acetona y agua MiliQ, llevándose a cabo las medidas a 25°C. La tabla 4.6 muestra los diámetros de partícula obtenidos para cada una de las muestras.

Tabla 4.6. Tamaños de partícula de los nanogeles de NIPA–co–DEA obtenidos por difusión de luz QELS.

Muestra	%NMBA	%SAL	Dp (nm) acetona	Dp (nm) agua
M1	5	5	63	91
M2	7	5	62	79
M3	10	5	61	80
M4	3	5	69	105
M5	5	5	72	108
M6	5	5	74	112
M7	5	0	85	119
M8	5	0	89	123
M9	5	0	93	127
M10	5	0	99	133
M11	5	5	92	125
M12	5	5	86	118
M13	5	5	81	111
M14	5	5	77	108
M15	5	3	67	95
M16	5	1	70	99
M17	5	8	64	91

Los datos que se presentan en la tabla anterior, corroboran la información obtenida mediante microscopía TEM, ya que por esta técnica se observaron nanopartículas (en estado xerogel) con un diámetro promedio de alrededor de 60 nm, mientras que los resultados obtenidos por QELS van desde ≈ 60 a 100 nm en dispersión de acetona. Las muestras dispersadas en agua mostraron un mayor diámetro de partícula, lo cual es lógico si consideramos que las nanopartículas sintetizadas son hidrófilas y, por lo tanto, tienen la capacidad de retener en su interior una gran cantidad de agua, teniendo menos afinidad por un disolvente orgánico como puede ser la acetona. Igualmente pueden apreciarse otras tendencias como, por ejemplo, la influencia del agente entrecruzante (NMBA) y de la composición de la alimentación de los monómeros, así como también, la concentración de sal (fosfato de dibutilo) añadida a la microemulsión.

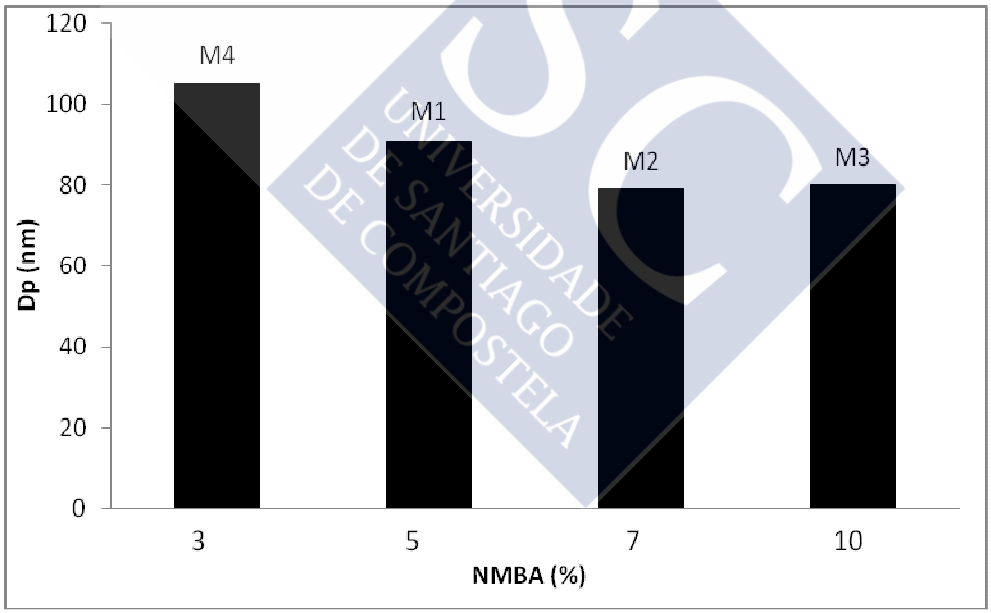


Figura 4.10. Tamaño de partícula (QELS) de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA) 95% NIPA en función del porcentaje de NMBA, dispersados en agua.

En la figura 4.10, así como en la tabla 4.6 se puede apreciar que el porcentaje de agente entrecruzante es un factor determinante en la capacidad de

hinchamiento de las nanopartículas, lo cual se ve reflejado en el diámetro de partícula. Esta disminución del diámetro de partícula debida al mayor entrecruzamiento de la red es un comportamiento ya bien definido de un hidrogel, ya que el agente entrecruzante disminuye la capacidad de absorción de la malla, debido al incremento en la densidad de nudos de la red. Sin embargo, existe un límite de concentración de NMBA, a partir del cual el tamaño de partícula no puede disminuir más, como se observa en las muestras M2 y M3 que contienen un 7 y 10% de NMBA, respectivamente y, sin embargo, el diámetro de partícula es prácticamente el mismo.

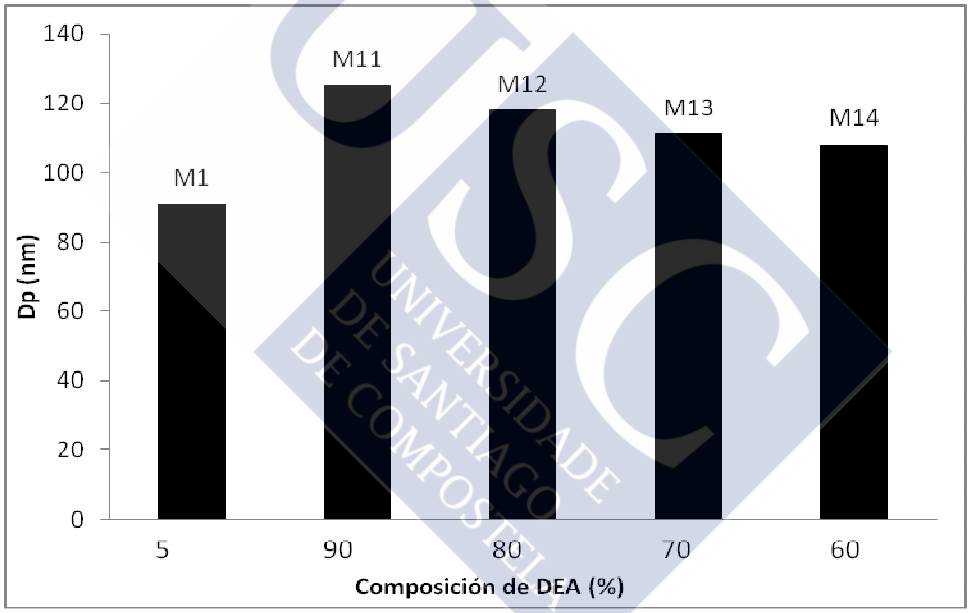


Figura 4.11. Tamaño de partícula (QELS) de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA) en función del porcentaje de DEA, dispersados en agua.

Otro de los parámetros de síntesis que mostró tener influencia en el diámetro de partícula fue la incorporación del monómero DEA en la red polimérica. En la figura 4.11 se observa que conforme se aumenta el porcentaje de DEA en la estructura polimérica también hay aumento en el diámetro de la partícula, pudiendo ésta tendencia deberse al que el monómero DEA favorece el

aumento del término iónico en el copolímero.

Por último, la incorporación de una sal produce una reducción del espacio en el interior de las micelas, debido a que la sal genera una serie de cargas en la fase continua. Éstas producen una reducción del tamaño de la micela por acción de fuerzas electrostáticas externas a dicha micela, limitando así el tamaño de las partículas. Este efecto puede observarse en la figura 4.12, de forma que cuando la concentración de fosfato de dibutilo aumenta, el tamaño de las partículas se reduce, y cuando la concentración de la sal es superior o igual al 5% (referida a la cantidad total de monómeros), el tamaño de las partículas no presenta un cambio apreciable y se mantiene prácticamente constante.

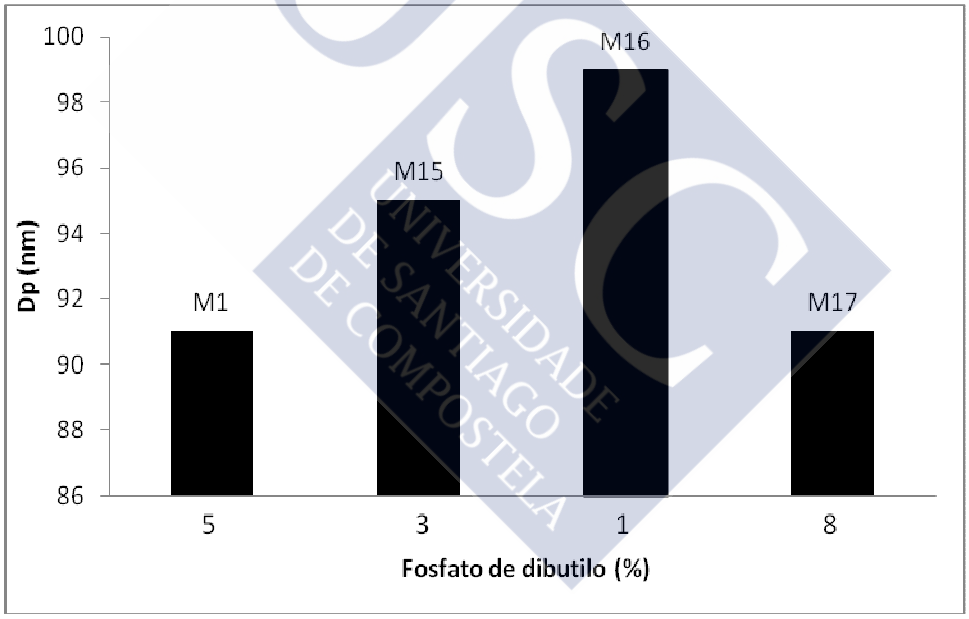


Figura 4.12. Tamaño de partícula (QELS) de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA) en función del porcentaje de fosfato de dibutilo, dispersados en agua.

4.2.9. Caracterización de la sensibilidad frente al pH.

Como se ha mencionado anteriormente, las propiedades de hinchamiento en función del pH de los nanogeles sintetizados, determinarán la validez de la posible

aplicación práctica de los mismos. Para esto, el metacrilato de 2–dimetilamino etilo (DEA) es un monómero metacrílico que posee en su estructura molecular grupos funcionales amino terciarios. Estos grupos funcionales son los que le proporcionan al nanogel sensibilidad al pH, por medio de la protonación y desprotonación del grupo amino (figura 4.13).

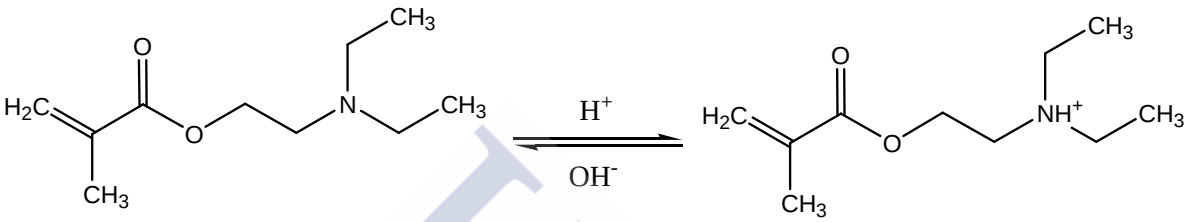
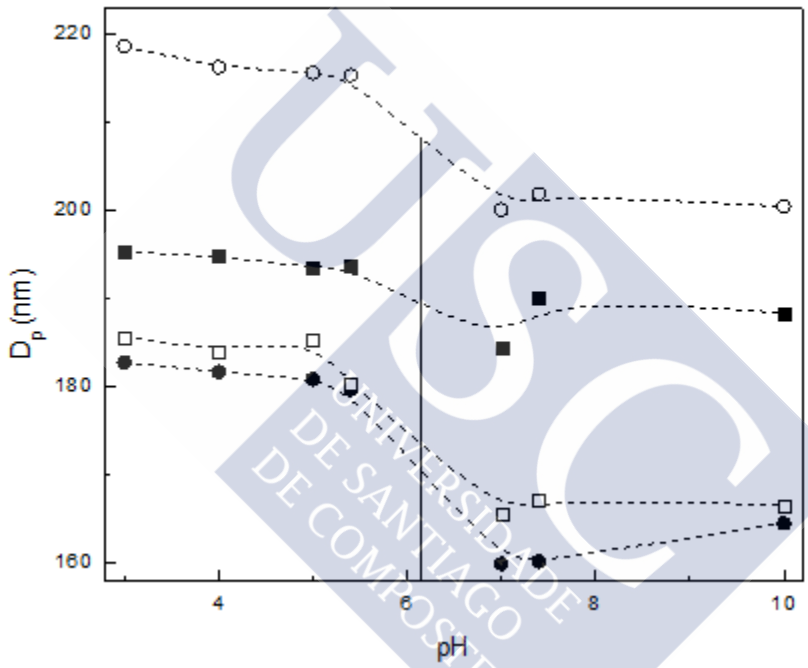


Figura 4.13. Esquema de la ionización del monómero DEA.

El grupo amino es un grupo ionizable catiónico, que en el monómero DEA presenta un valor de pKa de entre 7 y 7,3 (*Amalvy et al., 2004*), por lo que resulta ser un grupo interesante al presentar una pka cercana al pH fisiológico. Con el fin de evaluar el comportamiento de los nanogeles sintetizados, se realizó un estudio con difusión de luz quasielástica (QELS) para determinar la variación del tamaño de partícula en función del pH. Para esto, los nanogeles fueron dispersados en soluciones tampón a diferentes valores de pH.

En la figura 4.14 se presentan los resultados de hinchamiento respecto al pH para las muestras M1, M2, M3 y M4, las cuales fueron sintetizadas con el mismo porcentaje de monómeros (NIPA 95:5 DEA) pero con diferente porcentaje de agente entrecruzante. De esta figura podemos determinar que el valor de hinchamiento (pH_h), se encuentra para todas las muestras en un pH ≈ 6,1. Este valor de hinchamiento es considerablemente bajo si se toma en cuenta que el valor de la pKa del monómero DEA se encuentra en un intervalo de 7 y 7,3, sin embargo este valor es consistente con los resultados reportados por otros autores. Por ejemplo, *Amalvy et al.*, (2004) sintetizaron microgeles a partir del monómero DEA por polimerización en emulsión utilizando como estabilizadores estéricos

diferentes macromonómeros reactivos (diacrilato de polipropilenglicol (PPGDA), metacrilato de 2–diisopropilamino etilo (DPA)), obteniendo valores de pH_h (pH de hinchamiento) en un amplio intervalo (desde 6,0 hasta 7,6). En esta misma figura se observa el efecto de la concentración de agente entrecruzante estudiado previamente en la sección 4.2.8, en donde los nanogeles con un 3% de NMBA presentan los mayores valores de hinchamiento, y las muestras con 7 y 10% de NMBA no presentan valores muy similares.

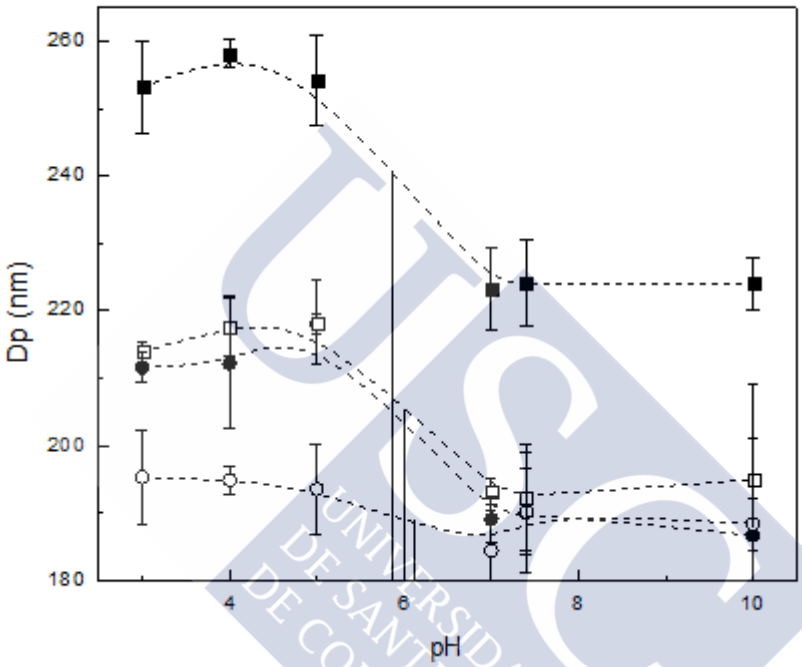


Muestra	NIPA (%)	DEA (%)	NMBA (%)
M1 (■)	95	5	5
M2 (□)	95	5	7
M3 (●)	95	5	10
M4 (○)	95	5	3

Figura 4.14. Hinchamiento dependiente del pH de nanogeles de NIPA/DEA con la misma composición y diferente porcentaje de entrecruzamiento.

Por otra parte, se observó que la proporción de la composición de los

nanogeles resulta ser un factor determinante de dos propiedades básicas 1) el grado de hinchamiento máximo y 2) pH de hinchamiento. En la figura 4.15 se muestra cómo es que a medida que aumenta el contenido de DEA, el hinchamiento de los nanogeles tanto en el estado colapsado como en el estado hinchado, aumenta, mientras que el valor del pH de hinchamiento se desplaza hacia valores inferiores.



Muestra	NIPA (%)	DEA (%)	NMBA (%)	pH_h
M1 (○)	95	5	5	6,1
M11 (■)	10	90	5	5,9
M12 (□)	20	80	5	6,0
M13 (●)	30	70	5	6,0

Figura 4.15. Desplazamiento del valor de pH_h en función del contenido de DEA.

Los nanogeles sintetizados se encuentran constituidos por dos dominios diferentes, concretamente la NIPA presenta un dominio no ionizable, mientras que

el monómero DEA presenta un dominio ionizable. Por lo tanto, un valor mayor de hinchamiento máximo respecto con la variación de la composición, se atribuye al aumento del monómero ionizable, el cual también desplaza el pH_h hacia valores inferiores de pH.

4.2.10. Caracterización de la sensibilidad frente a la temperatura.

El ejemplo más común y más estudiado de un polímero sensible a la temperatura es la poli(N–isopropilacrilamida), la cual se caracteriza por presentar una temperatura de punto crítico inferior en agua (LCST) cercana a los 32°C. Los hidrogeles sintetizados a partir de este monómero presentan propiedades de hinchamiento y deshinchamiento cuando la temperatura del medio se encuentra por arriba o por debajo de esta (LCST) (*Shibayama et al., 1996*). Se han estudiado las propiedades de hinchamiento de nuestros nanogeles a dos temperaturas distintas, primero a 25°C (descritas en las secciones 4.2.8 y 4.2.9) y a 37°C (temperatura del cuerpo humano en condiciones normales), considerando que al contener NIPA en su estructura, experimentarán transiciones de volumen diferentes a las estudiadas en las secciones anteriores.

La figura 4.16 muestra los resultados de hinchamiento (diámetro de partícula por QELS) para las muestras M11, M12, M14 y M1, que contienen un 10, 20, 30 y 95 % de NIPA respectivamente. Se observa que todas las muestras presentaron una disminución en el diámetro de partícula al aumentar la temperatura, mientras que al mismo tiempo conservan su capacidad de respuesta a variaciones de pH.

Otro factor que puede apreciarse es, que la reducción del diámetro de partícula se ve afectado por la proporción de NIPA que se encuentre en la estructura del nanogel. Por ejemplo, la muestra M11 (Figura 4.16 A) que contiene solamente un 10% del monómero, presenta valores de hinchamiento menores cuando la temperatura es 37°C, sin embargo son valores relativamente cercanos a los valores obtenidos a la temperatura de 25°C. Mientras que, la muestra M1

(Figura 4.16 D), que contiene un 95% de NIPA en su estructura, presenta valores de hinchamiento mucho menores cuando la temperatura del medio es de 37°C. Esto podría atribuirse a que al aumentar la proporción de los grupos hidrófilos e hidrófobos correspondientes a la NIPA, se produce un mayor efecto de colapsamiento, esto gracias a que son estos los grupos responsables de la transición de fase en volumen de la poli(NIPA) respecto con la temperatura.

Usualmente, los hidrogeles capaces de responder doblemente a estímulos de pH y temperatura, son copolimerizados por un monómero termosensible (como la NIPA) y un monómero pH sensible (como el DEA). Esto se debe a que son pocos los sistemas homopolimércos reportados en la literatura que sean capaces de responder a estímulos frente a la temperatura. Entre estos sistemas se encuentran el poli(metacrilato de 2–dimetilamino etilo) (PDMAEMA) (*Chen et al.*, 1997. *Cho et al.*, 1997), la poli(N–acriloil–N'alquil piperazina) (*Gan et al.*, 2001) y el poli(metacrilato de N–etil pirrolidona) (*González et al.*, 2005).

Sin embargo, *Schmalz et al.*, (2010), estudiaron la capacidad de estímulo–respuesta del homopolímero de DEA respecto de la temperatura, tanto en su estructura lineal como en su estructura molecular en forma de estrella; encontrando que en contraste con la literatura, este homopolímero no es sólo capaz de responder al pH, sino también a la temperatura, al igual que su homopolímero análogo poli(PDMAEMA).

Debido a las propiedades de estímulo–respuesta a la temperatura que presenta la poli(DEA), es que en nuestros resultados observamos que el pH de hinchamiento (pH_h) no solamente se ve afectado por la composición de alimentación de los monómeros (como se describió en la sección 4.2.9), sino que también se ve afectado por el efecto de la temperatura. Puede observase igualmente en la figura 4.16 que al aumentar la temperatura a 37°C el pH de hinchamiento se desliza hacia valores más ácidos. Este estudio del desplazamiento del pH_h hacia valores más ácidos ha sido reportado para el copolímero de poli(metacrilato de 2–dimetilamino etilo–co–butil metacrilato) (*Emileh et al.*, 2007), en el cual estudiaron el efecto del hinchamiento con respecto del pH a diferentes

temperaturas (15, 25, 37, 45, 55, y 65°C), obteniendo para todos los casos un desplazamiento del pH_h hacia valores más ácidos cuando se incrementó la temperatura del medio.

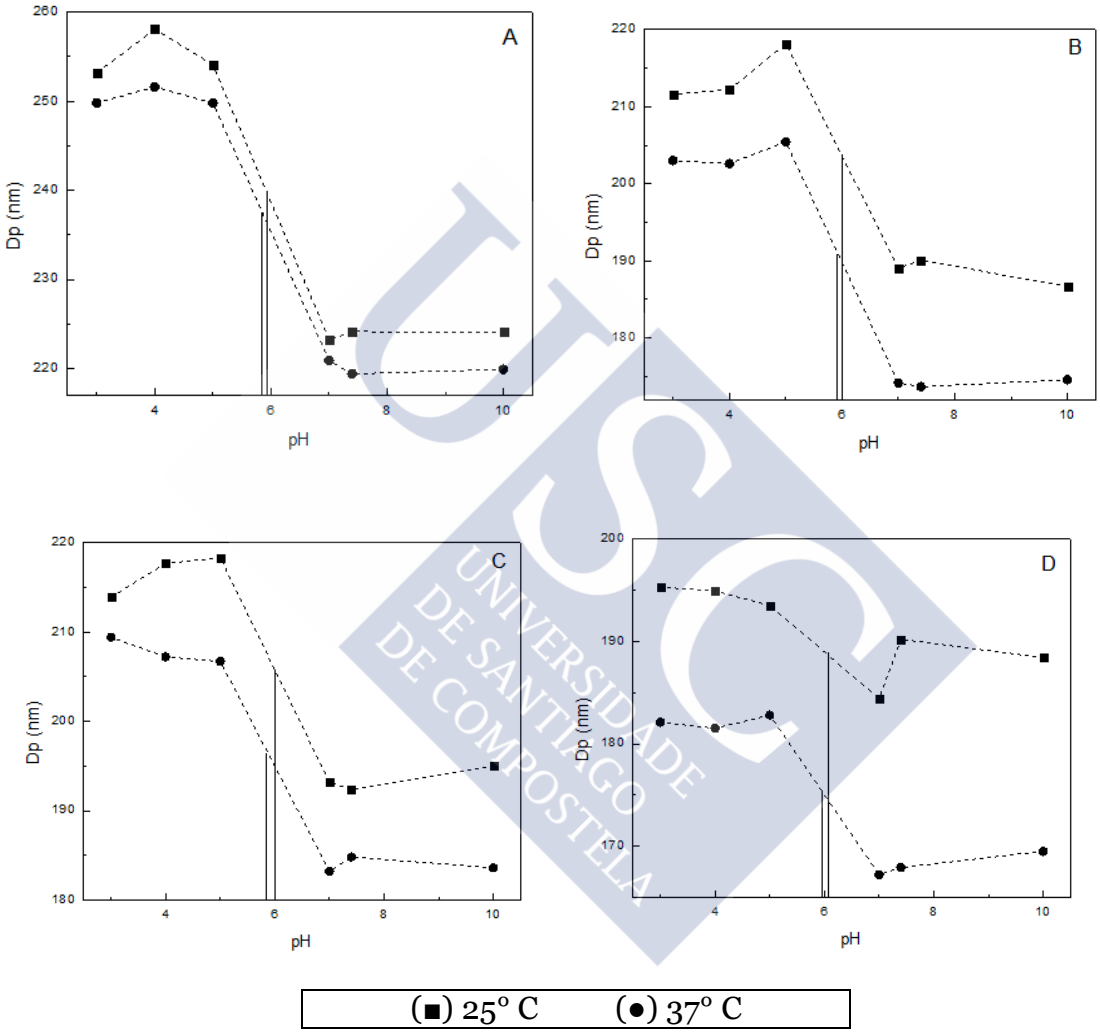


Figura 4.16. Diámetro de partícula de los nanogeles por QELS en función del pH a diferentes temperaturas. A) 10% NIPA (M11); B) 20% NIPA (M12); C) 30% NIPA (M13); D) 95% NIPA (M1).

4.3. Nanogeles sintetizados por nanoprecipitación

Cuando una nanopartícula es utilizada como un transportador de fármacos a través del cuerpo humano, se debe tener muy en consideración sus propiedades fisicoquímicas, tales como la composición, el tamaño, la morfología y sus propiedades superficiales, ya que son un factor determinante para la biodistribución y la farmacocinética de los medicamentos, mediante la modificación de las interacciones con el entorno biológico (*Hühn et al.*, 2013). Sin embargo, si la nanopartícula será inyectada por vía intravenosa, el tamaño se convierte en la característica más importante, ya que es un parámetro crucial durante el proceso de opsonización (proceso en el cual las opsoninas se encargan de fagocitar a los microorganismos o agentes extraños en el cuerpo para ser desechados posteriormente), ya que se ha demostrado que las partículas menores de 80 nm absorben una menor cantidad de opsoninas que las partículas de diámetros de alrededor de 200 nm (*Maeda et al.*, 2000).

Por las razones anteriores, es que hemos buscado sintetizar las nanopartículas de poli(NIPA–co–DEA) a partir de otro proceso de polimerización, que nos permitiera obtener diámetros de partícula más pequeños. Se eligió la polimerización en nanoprecipitación, que además presenta la ventaja de no necesitar agentes tensioactivos para la estabilización del sistema.

4.3.1. Sistema de reacción: medio de polimerización.

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema que se eligió para intentar disminuir los diámetros de partícula obtenidos mediante el proceso de microemulsión, fue la polimerización en nanoprecipitación.

La polimerización en nanoprecipitación es un sistema que nos permite obtener nanopartículas de una manera más sencilla que por el método de microemulsión, en el cual no se requiere la formación precursora de micelas, sino que un soluto hidrófobo (en este caso nuestros monómeros) es disuelto en un solvente polar orgánico (generalmente acetona o etanol) y después esta mezcla es

agregada en un no–disolvente (regularmente agua), formando una mezcla miscible en todas proporciones. La mezcla binaria se convierte en un no disolvente para el soluto hidrófobo, dando paso a una separación de fases y formación de las partículas.

Sin embargo, la dispersión instantánea de las nanopartículas sólo se generará a partir de las condiciones adecuadas, en donde existe un proceso espontáneo de emulsificación (sin requerir agentes tensioactivos) llamado "efecto Ouzo" (*Vitale y Katz, 2003*).

Conociendo los antecedentes anteriores, procedimos a estudiar las condiciones adecuadas para la formación de nanopartículas a partir de una mezcla binaria de agua y acetona en diferentes proporciones. En la tabla 4.7 se muestran las composiciones estudiadas para encontrar la estabilidad del sistema.

A partir de estas formulaciones, se estudió la estabilidad del sistema, encontrando que la única composición de la mezcla binaria que forma un proceso de emulsificación instantánea (efecto Ouzo) es la S2, ya que se observa una coloración azul–tornasol (semejante al de una microemulsión) que indica la presencia de diminutas partículas coloidales. Este efecto puede apreciarse en la figura 4.17, en la cual se muestra la coloración para el S2 y S3 después de finalizada la reacción. El sistema S3 no presentó ningún cambio de coloración al finalizar la reacción, mientras que el S2 presenta la coloración azul–tornasol mencionada anteriormente.

Tabla 4.7. Formulaciones iniciales para el estudio de la estabilidad del sistema por nanoprecipitación.

	Mezcla Binaria			
Sistema	Agua (% mol)	Acetona (%mol)	Monómeros totales (g)	Agente entrecruzante mmol
S1	94,16	5,84	3	6
S2	94,81	5,19	3	6
S3	88,26	11,74	3	6

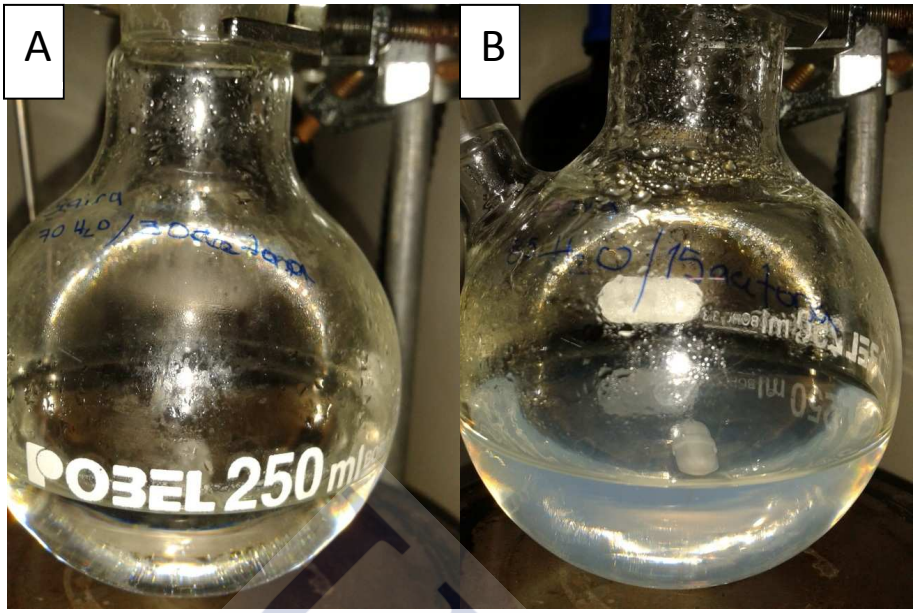


Figura 4.17. Coloraciones post–reacción obtenidas mediante nanoprecipitación para los sistemas (A) S3 y (B) S2. Observándose el efecto Ouzo.

Se midieron los diámetros de partícula de los látexes obtenidos para los sistemas S1, S2 y S3 por la técnica de QELS. A partir de estos resultados, se comprobó que el sistema S2 presenta diámetros de partícula menores a los sistemas S1 y S3, ya que este sistema es el único que presenta las condiciones adecuadas para la formación de nanopartículas. La tabla 4.8 presenta los diámetros de partícula obtenidos en disolución acuosa (pH = 7,4) para cada uno de los tres sistemas. Los diámetros de partícula resultantes fueron de 57 nm para el sistema S2, mientras que el sistema S1 y S3 presentan diámetros de 529 y 166 nm respectivamente.

Tabla 4.8. Diámetros de partícula para los látexes de los sistemas S1, S2 y S3.

Sistema	pH	Diámetro de partícula (nm)
S1	7,4	529
S2	7,4	57
S3	7,4	166

Los diámetros de partícula de los látexes obtenidos mediante QELS se

comprobaron por la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados para el sistema S1 se muestran en la figura 4.18. En esta figura (B) puede observarse que partículas pequeñísimas (≈ 20 nm) se encuentran contenidas dentro de núcleos de aproximadamente 500 nm (A), formadas durante el proceso de nucleación.

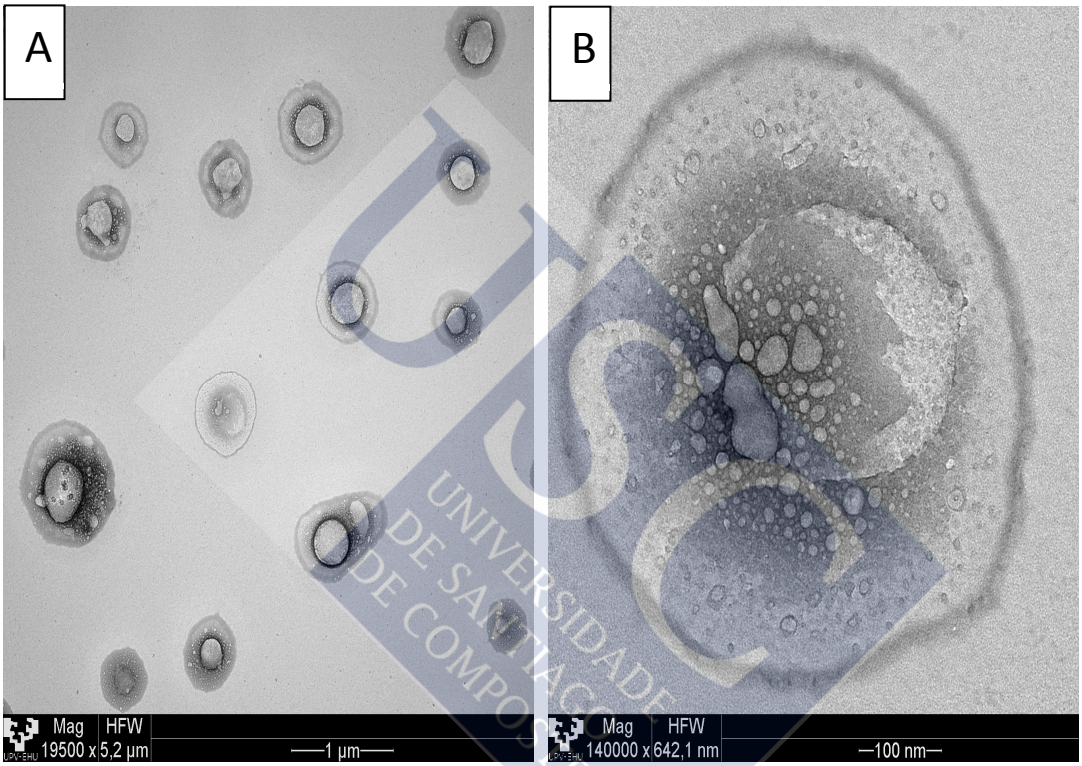


Figura 4.18. Micrografías TEM para el látex obtenido del A) sistema S1 B) ampliación de una zona para el sistema S1.

4.3.2. Muestras sintetizadas.

Como se ha descrito en la sección 4.3.1, una vez que fueron encontradas las proporciones adecuadas para la obtención de nanopartículas de poli(NIPA–co–DEA) por medio del método de polimerización en nanoprecipitación, se procedió a sintetizar diversas muestras con dos objetivos principales; el primero, estudiar sus propiedades de respuesta al pH y a la temperatura y segundo, hacer un

comparativo del mismo copolímero obtenido mediante el proceso de polimerización en microemulsión.

El sistema que presentó las mejores propiedades para la síntesis de las nanopartículas fue el sistema S2. Este sistema está compuesto por un 94,81 % mol de agua, un 5,19 % mol de acetona, 3g de monómeros y 6 mmol de agente entrecruzante. Para la síntesis de las diversas muestras de nanopartículas copoliméricas, se mantuvieron constantes estas cantidades, a excepción del agente entrecruzante, que se varió para obtener diferentes grados de entrecruzamiento de las partículas. El monómero se mantuvo siempre en 3 g, pero de esta cantidad se varió también la composición de NIPA y de DEA en los copolímeros.

. En la tabla 4.9 se precisan las proporciones exactas de cada componente para cada muestra sintetizada, así como su codificación, que se empleará a lo largo de su caracterización mediante diferentes técnicas analíticas que ser irán discutiendo a lo largo de este capítulo.

Para la codificación de las muestras sintetizadas se eligió como prefijo la letra N, haciendo referencia a que todas estas muestras se obtuvieron por el método de síntesis de polimerización en nanoprecipitación.

También es importante mencionar que la composición de monómeros en la tabla 4.9, está dada en porcentaje de uno respecto al otro, haciendo notar que como comentamos anteriormente, que la suma de ambos monómeros (monómero total en el sistema) corresponde a 3g para cada una de las reacciones.

Tabla 4.9. Identificación y formulaciones de síntesis para las muestras de NIPA–co–DEA sintetizadas.

	MEZCLA BINARIA				MONÓMEROS		AGENTE ENTRECRUZANTE
Código	***Agua (%mol)***	***Agua (g)***	***Acetona (%mol)***	***Acetona (g)***	***NIPA (%)***	***DEA (%)***	***NMBA (%)***
N1	94,81	85	5,19	15	66,66	33,33	30,8*
N2	94,81	85	5,19	15	33,33	66,66	30,8*
N3	94,81	85	5,19	15	50	50	30,8*
N4	94,81	85	5,19	15	95	5	30,8*
N5	94,81	85	5,19	15	5	95	30,8*
N6	94,81	85	5,19	15	95	5	20*
N7	94,81	85	5,19	15	5	95	20*
N8	94,81	85	5,19	15	95	5	5*

*Porcentaje calculado en base a la cantidad de monómeros totales en el sistema

4.3.3. Cinética de polimerización.

La cinética de polimerización fue seguida para el sistema en nanoprecipitación al igual que se realizó para el sistema en microemulsión. Se utilizó un método gravimétrico para conocer el tiempo en que la reacción alcanzaría el máximo porcentaje de conversión o rendimiento.

La de polimerización para este sistema no es rápida, ya que, se necesitaron 48 horas para dar por finalizada la reacción. Sin embargo, la conversión no se ve considerablemente afectada desde las 35 horas de reacción.

Los cálculos de rendimiento se calcularon mediante la ecuación 4.1 (véase la sección 4.2.2) al igual que se obtuvieron para el sistema en microemulsión. La figura 4.19 muestra la curva obtenida.

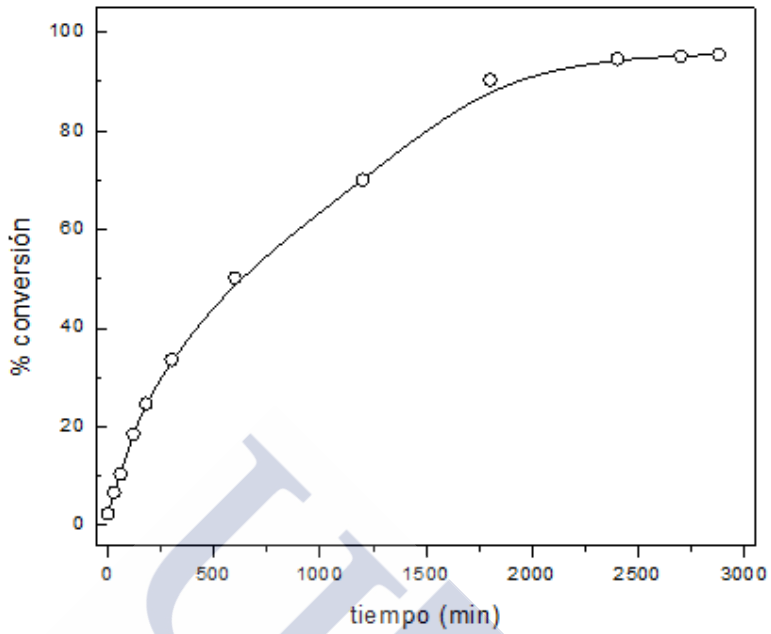


Figura 4.19. Cinética de copolimerización obtenida para la muestra N1 empleando un método gravimétrico.

Para todas las muestras se obtuvieron cinéticas de polimerización similares a la muestra N1. Los resultados de conversión fueron altos para todos los copolímeros. Se obtuvieron rendimientos por encima del 90 por ciento para todas las muestras sintetizadas.

Como puede apreciarse en la figura 4.19, el máximo rendimiento se alcanza alrededor de los 1.800 minutos (30 horas de reacción) y transcurrido este tiempo la conversión no se ve afectada considerablemente.

Los resultados de conversión para las muestras sintetizadas se muestran en la tabla 4.10, calculados por medio de un método gravimétrico.

Tabla 4.10. Porcentajes de rendimiento calculados para las muestras de NIPA–co–DEA.

Código de muestra	% de conversión
N1	95,2
N2	92,4
N3	96,3
N4	98,5
N5	96,6
N6	97,8
N7	96,4
N8	98,6

4.3.4. Caracterización mediante FTIR.

Al igual que para las nanopartículas obtenidas por la técnica de polimerización en microemulsión, los espectros obtenidos por FTIR fueron el primer acercamiento para la caracterización de la cadena polimérica para las muestras sintetizadas mediante polimerización en nanoprecipitación.

El espectro FTIR para el nanogel N1 se muestra en la figura 4.20. En esta imagen pueden observarse las bandas características del copolímero de poli(NIPA–co–DEA), que se detallaron en la sección 4.2.3. En esta misma figura, se representa el FTIR obtenido para la muestra M1 (después del quinto lavado con dietil éter) obtenida mediante el proceso de polimerización en microemulsión.

La comparación de ambos espectros resulta importante ya que, la muestra M1 requirió de cinco lavados con dietil éter para la remoción de la mezcla de agentes tensioactivos (banda de 1.730 cm–1, misma banda correspondiente para el carbonilo tipo éster del monómero DEA), mientras que la polimerización en nanoprecipitación nos permite la obtención de un espectro similar sin la necesidad de limpieza alguna. Por lo que esta técnica resulta interesante para la síntesis de nanopartículas copoliméricas.

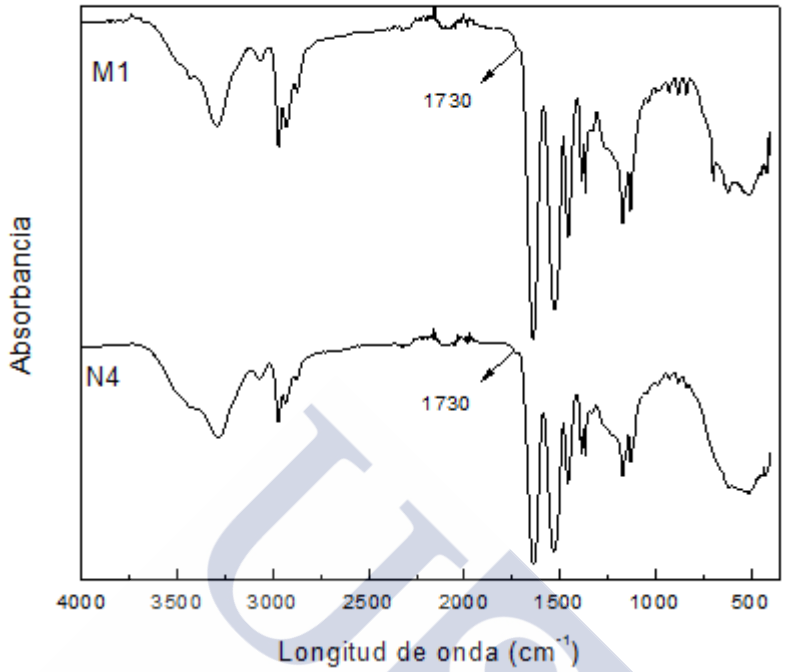


Figura 4.20. Espectros FTIR para las muestras M1 (lavado 5) y N1.

4.3.5. Caracterización mediante RMN de protón.

La composición molar real de los monómeros, se calculó mediante RMN de protón, al igual que se hizo para las muestras sintetizadas mediante copolimerización por microemulsión. Las muestras fueron preparadas mediante la dispersión de los nanogeles en dimetilsulfóxido deuterado (C_2D_6OS).

Los cálculos se realizaron mediante la integración de los picos correspondientes a los protones isopropílicos del monómero DEA y los protones isopropílicos de la NIPA, utilizando la ecuación 4.2 (sección 4.2.5).

En la figura 4.21 se muestra el espectro correspondiente a la muestra N5 (NIPA 5:95 DEA), en la cual podemos observar un espectro muy similar a los obtenidos mediante polimerización en microemulsión. Espectros similares se obtuvieron para cada una de las muestras sintetizadas por polimerización en nanoprecipitación. La tabla 4.11 recoge las composiciones calculadas para cada uno

de los monómeros en el copolímero.

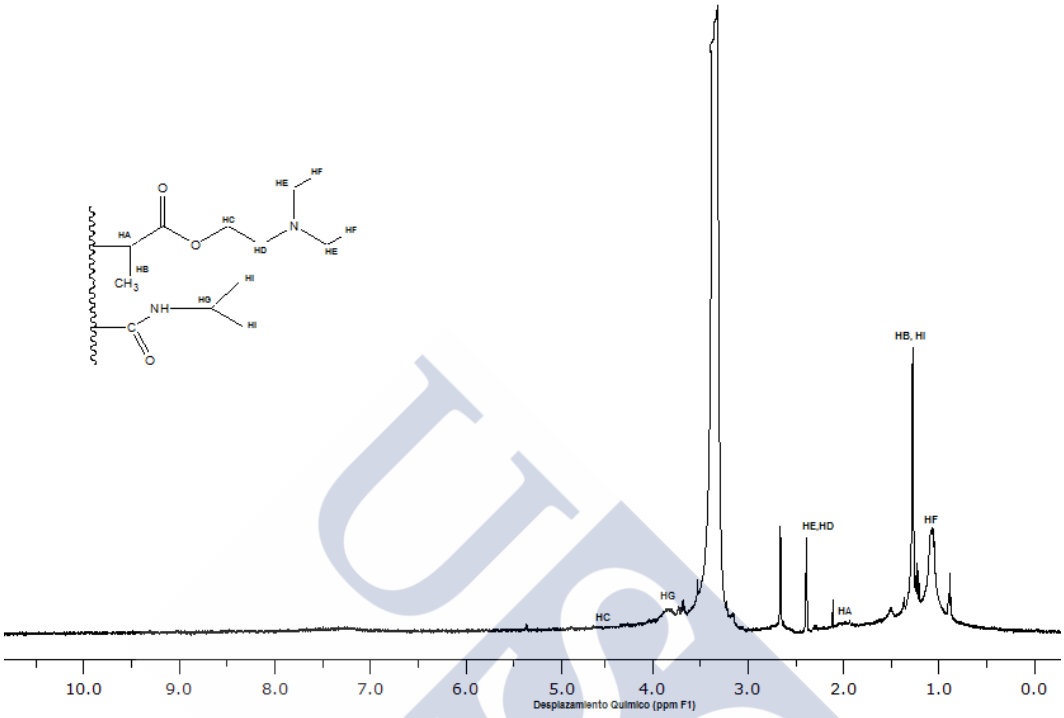


Figura 4.21. Espectro RMN de protón de la muestra N5.

Tabla 4.11. Composición de los nanogeles NIPA–DEA sintetizados, determinada por RMN.

Código de muestra	%mol NIPA	%mol DEA
N1	64,3	35,7
N2	36,5	63,5
N3	52,7	47,3
N4	96,4	3,6
N5	4,3	95,7
N6	96,2	3,8
N7	4,6	95,4
N8	93,9	6,1

4.3.6. Caracterización térmica mediante DSC.

La figura 4.22 presenta los termogramas obtenidos para dos de los nanogeles de NIPA–co–DEA (muestras N1 y N4). En estas curvas calorimétricas se observa que los nanogeles presentan una única temperatura de transición vítrea (T_g) situada a 56,8 y 62,6 °C respectivamente. Estos valores de T_g se encuentran localizados entre las temperaturas de transición vítrea de los homopolímeros de los monómeros precursores, siendo de ≈ 104°C para la NIPA y ≈ 16°C para el DEA. Esta transición vítrea está influenciada por la presencia de ambos monómeros. Dependiendo de cuál de los dos monómeros se encuentra en mayor proporción, la T_g se ve desplazada mayoritariamente hacia el valor de la Tg del homopolímero. Estos mismos resultados del desplazamiento de la Tg, fueron obtenidos para las nanopartículas de NIPA–co–DEA sintetizadas mediante polimerización en microemulsión (sección 4.2.6).

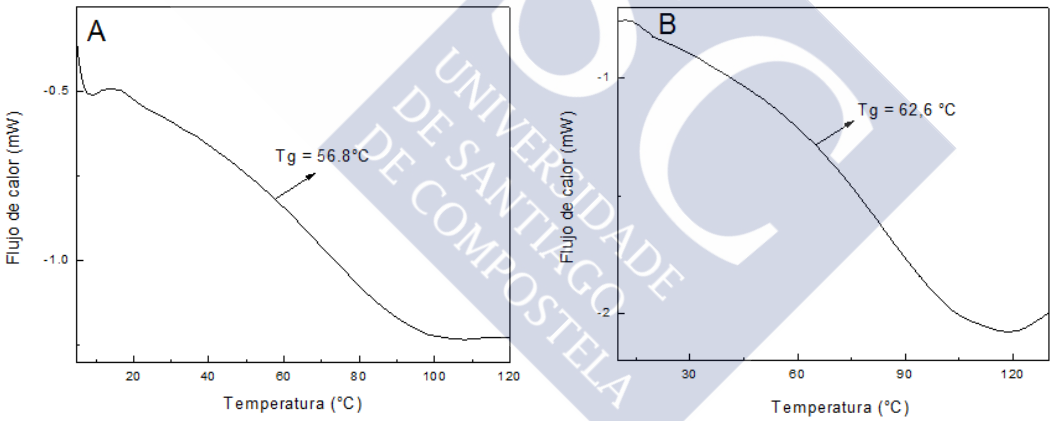


Figura 4.22. Termogramas correspondientes a la región de la transición vítrea en las muestras de nanogeles NIPA–DEA sintetizadas con diferentes composiciones. (A) N1 y (B) N4.

En la tabla 4.12 pueden verse las temperaturas de transición vítrea obtenidas para las muestras de nanogeles de NIPA–co–DEA, sintetizadas con diferentes composiciones. En donde se puede observar más claramente el efecto de la composición de los monómeros en el desplazamiento del valor de la T_g. Los valores

obtenidos confirman lo comentado anteriormente. La T_g de las nanopartículas se ve desplazada hacia valores de temperatura más cercanos al valor de la T_g del homopolímero predominante en la cadena.

Tabla 4.12. Temperatura de transición vítrea de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA) entrecruzados con diferentes proporciones de NMBA en función del porcentaje de los monómeros.

Muestra	NIPA (%)	DEA (%)	T_g (°C)
N1	66,66	33,33	56,8 ± 0,3
N2	33,33	66,66	58,3 ± 0,2
N3	50	50	59,3 ± 0,1
N4	95	5	62,6 ± 0,2
N5	5	95	53,2 ± 0,2
N6	95	5	62,6 ± 0,1
N7	5	95	53,1 ± 0,2
N8	95	5	62,5 ± 0,1

4.3.7. Tamaño de partícula por microscopia TEM.

La microscopía electrónica de barrido nos permitió la visualización de las nanopartículas obtenidas por polimerización en nanoprecipitación, así como tener el primer parámetro para la determinación del diámetro de partícula.

En la figura 4.24 se presentan las micrografías TEM para dos de los nanogeles sintetizados (N1 y N8). En esta figura se observa que los diámetros obtenidos mediante este proceso de síntesis (nanoprecipitación) pueden llegar a ser muy pequeños (≈15 nm), así como la forma esférica de las partículas. También puede observarse que existe un cierto grado de polidispersidad. Sin embargo, la mayoría de las partículas tienen diámetros muy parecidos. Micrografías similares se obtuvieron para todas las muestras sintetizadas.

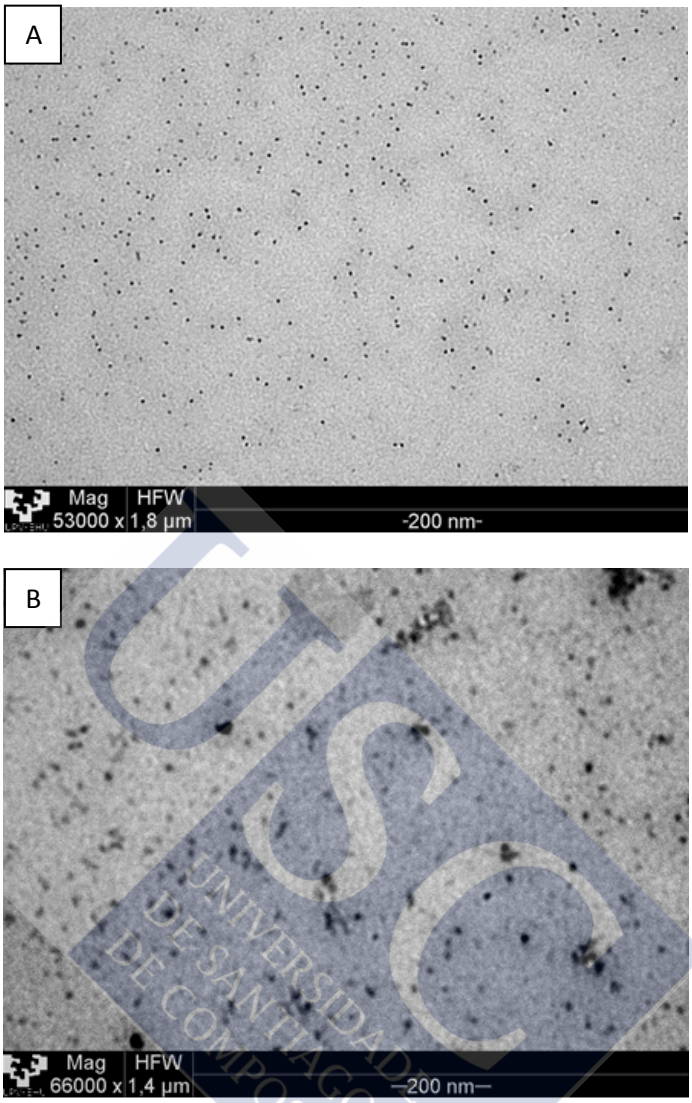


Figura 4.23. Micrografías TEM de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA). Muestra N1 (A) y muestra N8 (B).

4.3.8. Tamaño de partícula por difusión de luz (QELS).

Los diámetros de partícula obtenidos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se corroboraron mediante difusión de luz quasielástica (QELS).

La tabla 4.13 muestra el tamaño de partícula para todas las muestras sintetizadas por polimerización en nanoprecipitación. Los datos que se presentan en la misma, muestran que los nanogeles presentan, para todas las formulaciones, tamaños de partícula pequeños, que son coherentes con los diámetros de partícula

obtenidos mediante microscopia electrónica de transmisión. En esta tabla se aprecia, igualmente, el efecto del agente entrecruzante y de la composición de alimentación de los monómeros. A mayor agente de entrecruzamiento, el diámetro de partícula disminuye. Mientras que a mayor concentración del monómero DEA en la cadena polimérica, el diámetro de la partícula aumenta.

Tabla 4.13. Tamaños de partícula de los nanogeles de NIPA–co–DEA obtenidos por QELS.

Muestra	%NMBA	Dp (nm) acetona	Dp (nm) agua
N1	30,8	20	29
N2	30,8	26	35
N3	30,8	23	32
N4	30,8	19	27
N5	30,8	31	45
N6	20	35	48
N7	20	39	52
N8	5	46	58

En la figura 4.24, así como en la tabla 4.13 se puede apreciar claramente el efecto antes mencionado, de la influencia de la composición de los monómeros en el diámetro de partícula. Al igual que para las muestras sintetizadas por polimerización en microemulsión, podemos observar que una mayor composición del monómero DEA se ve reflejado en un mayor diámetro de partícula. Efecto que atribuimos a la ionización de dicho monómero y su capacidad para retener una mayor cantidad de agua.

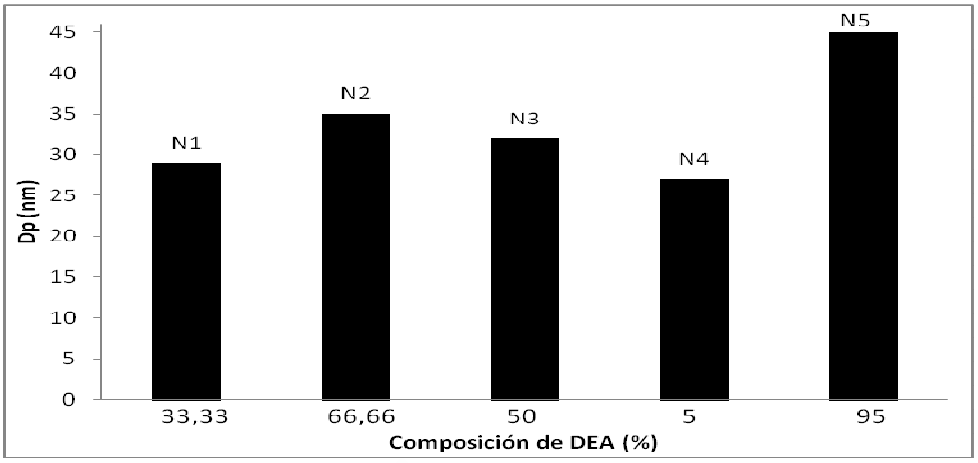


Figura 4.24. Tamaño de partícula (QELS) de nanogeles de poli(NIPA–co–DEA) en función del porcentaje de DEA, dispersados en agua.

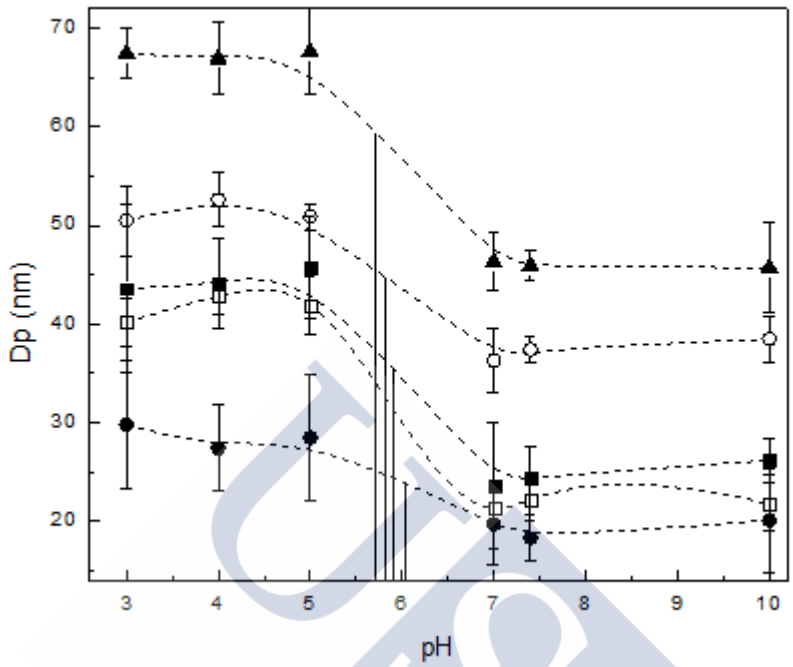
4.3.9. Caracterización de la sensibilidad frente al pH.

Como se ha comentado anteriormente, la sensibilidad al pH de las nanopartículas es la clave fundamental para el sustento de este trabajo. Las nanopartículas de NIPA–co–DEA sintetizadas por polimerización en microemulsión, presentaron un buen cambio en el hinchamiento, respecto del pH.

Con el fin de evaluar el comportamiento de los nanogeles de NIPA–co–DEA sintetizados por polimerización en nanoprecipitación, se realizó un estudio con difusión de luz quasielástica para determinar la variación del tamaño de partícula en función del pH.

En la figura 4.25 se muestra cómo es que a medida que aumenta el contenido de DEA, el hinchamiento de los nanogeles tanto en el estado colapsado como en el estado hinchado, aumenta, mientras que el valor del pH de hinchamiento se desplaza ligeramente hacia valores inferiores, encontrándose que el valor de pH_h para todas las muestras se encuentra en un intervalo de ≈ 5,7 hasta 6,1; resultados que se corresponden con las muestras sintetizadas por polimerización en microemulsión. Sin embargo, el diámetro hidrodinámico de las partículas es considerablemente menor para los nanogeles sintetizados por nanoprecipitación. El desplazamiento del valor de pH_h se atribuye al aumento del

monómero ionizable.



Muestra	NIPA (%)	DEA (%)	NMBA (%)	pH_h
N1 (□)	66,66	33,33	30,8	6,0
N2 (○)	33,33	66,66	30,8	5,9
N3 (■)	50	50	30,8	6,0
N4 (●)	95	5	30,8	6,1
N5 (▲)	5	95	30,8	5,8

Figura 4.25. Desplazamiento del valor de pH_h en función del contenido de DEA.

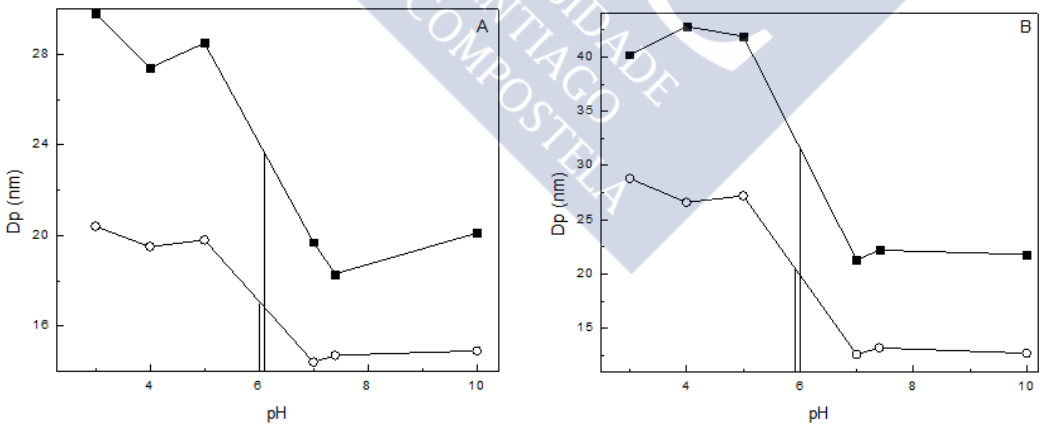
4.3.10. Caracterización de la sensibilidad frente a la temperatura.

Se han estudiado las propiedades de hinchamiento de los nanogeles a dos temperaturas distintas, primero a 25°C (descritas en las secciones 4.3.8 y 4.3.9) y a 37°C (temperatura del cuerpo humano en condiciones normales), considerando nuevamente una reducción del volumen de las nanopartículas cuando se produzca un aumento de temperatura, ya que contienen NIPA en su estructura, y como hemos mencionado anteriormente, este homopolímero presenta una bien definida

temperatura de punto crítico inferior en agua (LCST) cercana a los 32°C.

La figura 4.26 muestra los resultados de hinchamiento (diámetro de partícula por QELS) para las muestras N1, N2 y N4, que contienen un 66,33, 33,66 y 95 % de NIPA respectivamente. Primeramente se observa que todas las muestras presentaron una disminución en el diámetro hidrodinámico de las partículas al aumentar la temperatura, mientras que al mismo tiempo conservan su capacidad de respuesta a variaciones de pH.

La reducción del diámetro de partícula se ve afectado por la proporción de NIPA que se encuentre en la estructura del nanogel. Una mayor cantidad de NIPA en la estructura de las nanopartículas, provoca un diámetro de partícula considerablemente menor. Esto podría atribuirse a que al aumentar la proporción de los grupos hidrófilos e hidrófobos correspondientes a la NIPA, se produce un mayor efecto de colapsamiento, esto gracias a que son estos los grupos responsables de la transición de fase en volumen de la poli(NIPA) respecto con la temperatura.



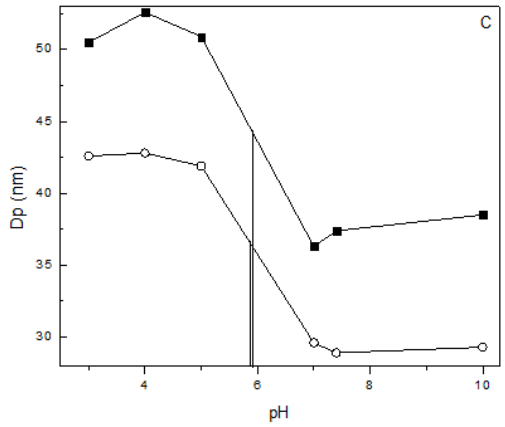


Figura 4.26. Diámetro de partícula de los nanogeles por QELS en función del pH a diferentes temperaturas. A) 95% NIPA (N4); B) 66,33% NIPA (N1); C) 33,3% NIPA (N2).

4.4. Encapsulación y liberación de fármacos.

Los nanogeles de NIPA–co–DEA están diseñados principalmente para su uso en la terapéutica contra el cáncer, por lo que la elección de los principios activos que serán transportados por este sistema, deberán cumplir con las características deseadas en un fármaco antineoplásico.

Los fármacos seleccionados fueron el 5–fluoracilo, la metformina y la terfenadina. Aunque no todos ellos son de la familia de los fármacos antineoplásicos, se han seleccionado por su comprobada eficacia para atacar las células tumorales. En las siguientes secciones se detallará cada uno de los fármacos.

La técnica de ultravioleta visible (UV–VIS) nos permitió realizar las pruebas de encapsulación y liberación de dichos fármacos, ya que cada uno de estos fármacos presenta una definida longitud de onda en el espectro visible.

4.5. 5–Fluoracilo.

El 5–fluoracilo es uno de los fármacos que ha sido mayormente utilizado en el tratamiento contra el cáncer (*Cai et al., 2006; Cao et al. 2000 y Kubota,* 1999). Éste medicamento pertenece a la categoría de fármacos de quimioterapia llamados antimetabolitos.

Los antimetabolitos son sustancias muy similares a las sustancias normales que se encuentran dentro de las células, que cuando son incorporadas al metabolismo celular, la célula pierde su capacidad para dividirse.

Los antimetabolitos se clasifican de acuerdo con la sustancia con que interfieren; siendo el 5–Fu un antagonista de las pirimidinas, por lo tanto, su mecanismo de acción consiste en que interfiere directamente en la síntesis del ADN, actuando como inhibidor de la proteína timidilato sintasa (*Longley et al., 2003; Parker y Cheng, 1990*), evitando la formación de ARN. Por lo tanto, sin la formación de ARN, el ADN no podrá replicarse, lo que inhibe la división celular y por lo tanto el crecimiento tumoral. La figura 4.27 muestra la estructura molecular del 5–fluoracilo.

Debido a estas propiedades, el encapsulamiento y liberación del 5–Fu ha sido ampliamente estudiado (*Blanco et al., 2008 y 2011*).

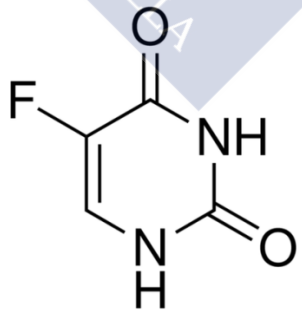


Figura 4.27. Estructura química del 5–fluoracilo (5–Fu).

4.5.1. Selección de la longitud de onda (λ) de absorción del 5–Fu y curva de calibrado.

Antes de comenzar con las pruebas de liberación del 5–fluoracilo (5–Fu) a través de las nanopartículas, se procedió a determinar la longitud de onda correspondiente al pico máximo de absorción de dicho fármaco por ultravioleta visible. Para esto se prepararon estándares con diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ppm). Para la determinación del pico máximo de absorción, se realizaron diversos escaneos de las disoluciones, a diferentes longitudes de onda, que iban desde los 600 a los 200 nm.

En la tabla 4.14 se presentan las concentraciones utilizadas para dicha prueba, en ppm y en moles por litro. También los gramos de fármaco utilizados por cada 100ml de agua miliQ.

Tabla 4.14. Concentraciones de 5–FU utilizadas para la realización de la curva de calibrado y la determinación del pico máximo de absorción por UV–VIS.

Conc. ppm	Conc. mol•L^{-1}	mg 5–FU/ 100ml agua
5	$3.019 \cdot 10^{-5}$	0.5
10	$6.038 \cdot 10^{-5}$	1
15	$9.058 \cdot 10^{-5}$	1.5
20	$1.207 \cdot 10^{-4}$	2
25	$1.509 \cdot 10^{-4}$	2.5
30	$1.811 \cdot 10^{-4}$	3
35	$2.113 \cdot 10^{-4}$	3.5
40	$2.415 \cdot 10^{-4}$	4

Una vez realizados estos barridos, se determinó que el punto máximo de absorción del 5–Fu se presentó a una longitud de onda λ = 265 nm, lo cual corresponde a la longitud de onda reportada por otros autores (*Guerrero Ramírez, Tesis doctoral, 2009).*

En la figura 4.28 se presentan los valores de absorbancia tomados a cada longitud de onda desde los 600 a los 200 nm. En esta imagen se puede apreciar que de los 600 a los 300 nm, el 5–Fu no presenta una absorción considerable, mientras que a partir de los 300 nm comienza a presentar un aumento en el valor de absorbatividad molar, hasta alcanzar el punto máximo a la longitud de 265 nm, como ya se había comentado anteriormente. Por lo tanto, esta longitud de onda fue seleccionada para realizar los experimentos de encapsulación y liberación del fármaco.

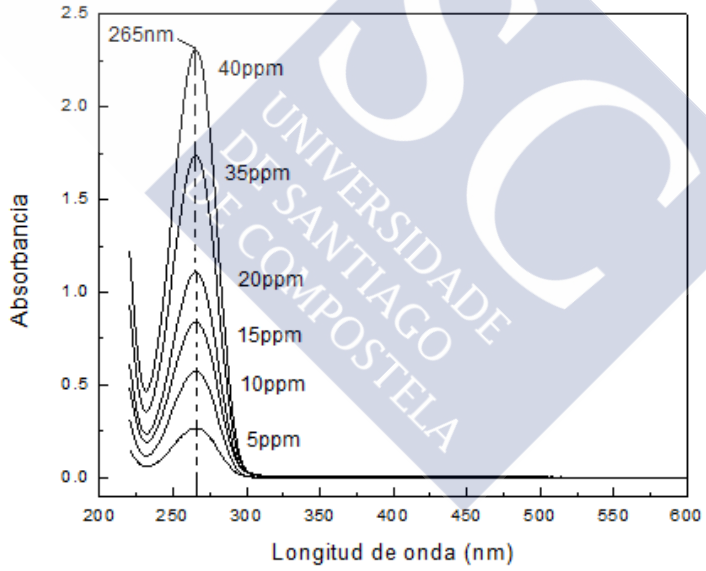


Figura 4.28. Determinación del pico máximo de absorción del 5–Fu por UV–VIS.

Para obtener la ecuación de la recta que nos permitió calcular las concentraciones de fármaco tanto encapsulado como liberado por las nanopartículas, se procedió a representar el valor de absorbancia obtenido en el

punto máximo de absorción del 5–Fu (λ = 265 nm) para cada una de las concentraciones anteriores, tal como se muestra en la figura 4.29.

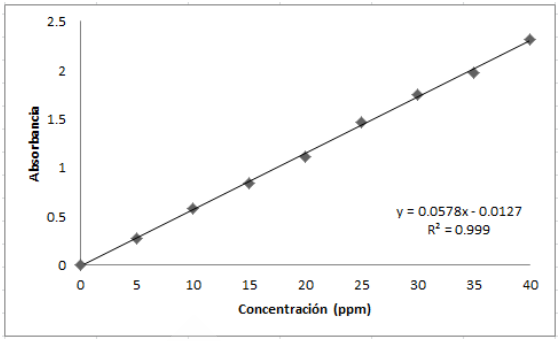


Figura 4.29. Curva de calibración del 5–FU por UV–Vis y su respectiva ecuación de la recta.

Mientras tanto, en la tabla 4.15 se muestran los valores de absorbancia correspondientes al punto máximo de absorción (longitud de onda λ = 265 nm).

Tabla 4.15. Valores de absorbancia del 5–FU en el punto máximo de absorción por UV–VIS.

Concentración/ppm	Absorbancia
0	0
5	0.26648
10	0.57569
15	0.83830
20	1.10812
25	1.46781
30	1.74141
35	1.97321
40	2.31162

Antes de comenzar el siguiente apartado, es importante resaltar que, la

ecuación de la recta obtenida en nuestra curva de calibrado presenta una tendencia prácticamente lineal, presentando un valor de R^2 = 0,999, por lo que se puede aplicar perfectamente la ley de Lambert–Beer para realizar los cálculos correspondientes.

4.5.2. Nanopartículas sintetizadas por polimerización en microemulsión.

4.5.2.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–Fu dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución.

Para poder elegir la concentración con la cual serían cargados los nanotransportadores con el fármaco, se prepararon soluciones de 5–Fu, comenzando por una baja concentración y aumentándola considerablemente.

Con esto, podríamos saber, si la concentración inicial de la solución de carga, interferirá o no en la cantidad de fármaco que se adentre en la red entrecruzada de los nanohidrogeles.

A continuación, la tabla 4.16 presenta las concentraciones iniciales y finales de las soluciones de 5–Fu, a partir de la cual se calcularon los porcentajes del fármaco retenidos en las nanopartículas. Estos porcentajes se muestran en la figura 4.30, en donde se puede observar que de las tres concentraciones estudiadas, aparentemente las nanopartículas que estuvieron en contacto con la solución de concentración de $2{,}5\cdot10^{-3}$ M, retuvieron una cantidad mucho menor del 5–Fu, sin embargo, si consideramos que este porcentaje se encuentra calculado en base a la concentración inicial, y si observamos en la tabla 4.16, podremos darnos cuenta de que las ppm retenidas en el nanogel tanto para la concentración de $2\cdot10^{-3}$ M como para la de $2{,}5\cdot10^{-3}$ M son las mismas (≈ 20 ppm), mientras que en la solución con concentración de $4{,}5\cdot10^{-3}$M, las nanopartículas retuvieron una cantidad considerablemente mayor (≈ 80 ppm).

Para el cálculo de los porcentajes de fármaco retenido en las nanopartículas, se consideró la concentración inicial real calculada como el 100 por ciento; a partir de la resta de la concentración de la solución final a la concentración de la solución inicial (ambas lecturas obtenidas por UV–Vis).

Tabla 4.16. Valores de las concentraciones en las soluciones iniciales y finales de 5–FU valoradas por UV–VIS.

	Concentraciones					
Muestra	inicial teórica (M)	Inicial real calculada M	Inicial ppm	final (M)	final ppm	ppm en el nanogel
M1	$1{,}0\cdot10^{-3}$	$1{,}09\cdot10^{-3}$	142,2	$9{,}33\cdot10^{-4}$	121,6	20,6
M1	$2{,}5\cdot10^{-3}$	$2{,}42\cdot10^{-3}$	315,1	$2{,}26\cdot10^{-3}$	294,6	20,5
M1	$4{,}5\cdot10^{-3}$	$3{,}96\cdot10^{-3}$	515,7	$3{,}34\cdot10^{-3}$	435,4	80,3

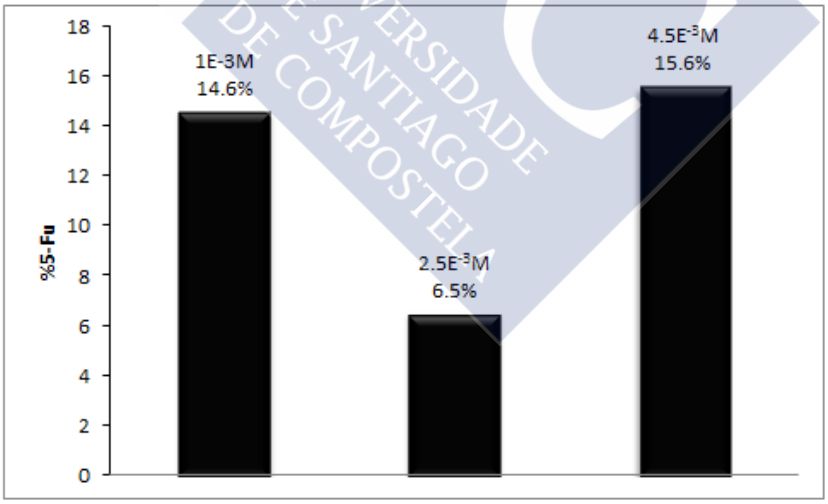


Figura 4.30. Porcentaje de 5–FU atrapado en las nanopartículas, en base a la concentración de la solución inicial para la muestra M1.

Después, se procedió a expresar los resultados anteriores en la unidad de

miligramos de 5–Fu atrapados en cada gramo de nanopartículas (mg·g^{-1}); para esto se utilizó la ecuación 4.3.

$$q = \frac{V}{W}\left([5\text{-FU}]_i - \left[[5\text{-FU}]\right]_f\right) \qquad (4.3)$$

Dónde:

q = cantidad de 5–Fu adsorbido por gramo de nanopartículas en base seca (mg 5–Fu/g de nanopartículas.)
V = volumen de la solución de 5–Fu (L).
[5–Fu]i = concentración inicial de 5–Fu en la solución (mg·L^{-1}).
[5–Fu]f = concentración remanente de 5–Fu en la solución (mg·L^{-1}).
w = masa de las nanopartículas en estado seco (g).

En la figura 4.31, puede observarse mejor el efecto antes mencionado, en donde a bajas concentraciones de 5–Fu en la solución inicial de contacto, la cantidad retenida en las nanopartículas también será menor, mientras que al aumentar la concentración del fármaco, también incrementará la cantidad de éste retenido en la red de los nanohidrogeles. Por lo tanto, para el estudio de las liberaciones de 5–Fu por medio de la técnica de UV–Vis, se procederá a cargar las muestras con aquella concentración que mostró un mejor resultado (4,5·10^{-3}M).

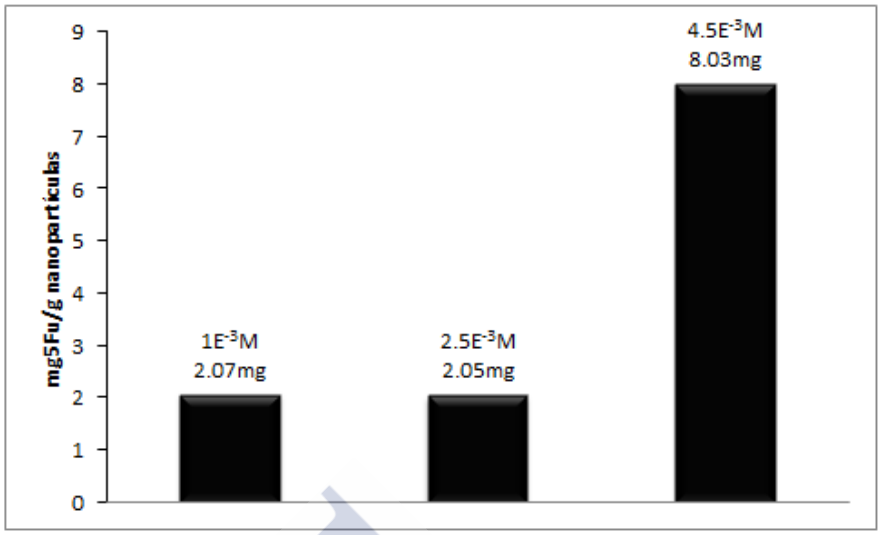


Figura 4.31. 5–Fu retenido en las nanopartículas, representado en mg•g^{-1} de nanopartículas para la muestra M1.

4.5.2.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–Fu dependiendo del grado de entrecruzamiento de las nanopartículas.

Como se ha descrito anteriormente, en la sección experimental, la síntesis de las nanopartículas de poli(N–isopropilacrilamida–co–metacrilato de 2–dimetilamino etilo) se varió tanto en la cantidad de alimentación inicial de los monómeros, como en el porcentaje inicial de agente entrecruzante (NMBA), esto con el objetivo de tener una amplia variedad de muestras y poder así determinar su eficacia en la liberación de los diversos fármacos. Por lo que, estas características serán fundamentales también en la capacidad de la muestra para encapsular el fármaco en su interior.

Las nanopartículas sintetizadas en ésta tesis, son nanohidrogeles, y los hidrogeles se caracterizan por presentar diversas propiedades, siendo una de las más importantes su capacidad para hincharse y retener grandes cantidades de agua y otras sustancias disueltas en el agua. Éste hinchamiento se debe a diversos factores como lo son la naturaleza de las cadenas poliméricas, el pH de la solución, la temperatura y el grado de entrecruzamiento de la red (*Blanco et al., 2007 y*

Katime et al., 2003).

En este apartado se describe la capacidad que presentan las nanopartículas para retener en su estructura el fármaco 5–Fu, basándonos en la cantidad de agente entrecruzante (grado de entrecruzamiento) utilizado durante el proceso de síntesis.

Para realizar este experimento se eligieron las muestras con composición monomérica de NIPA 95:5 DEA, variando el porcentaje de agente entrecruzante (NMBA) de 3, 7, y 10% (M4, M2, y M3 respectivamente).

Los resultados obtenidos fueron los esperados. En la figura 4.32, puede observarse que a mayor cantidad de agente entrecruzante en la muestra, la cantidad de 5–Fu retenido en la estructura de los nanogeles menor. Esto es congruente con lo explicado anteriormente, en donde se comentó que el grado de entrecruzamiento es uno de los factores que determinan el grado de hinchamiento de un hidrogel o nanohidrogel; a menor cantidad de agente entrecruzante, el hinchamiento de la red es mayor y permitirá una mayor difusión de agua y de las sustancias disueltas en ella (en este caso el fármaco 5–FU) hacia el interior de la partícula, siendo así que la muestra M4, con una composición de 3% de NMBA, es la que presenta una mayor cantidad de 5–FU retenida (13,9 $mg \cdot g^{-1}$ de nanohidrogel), y la composición de 10% de NMBA la que presenta la menor cantidad (10,3 $mg \cdot g^{-1}$ nanohidrogel).

Un factor importante a considerar, será tener en cuenta que, aun cuando el menor porcentaje de entrecruzamiento, es el que retiene la mayor cantidad de fármaco, nos encontramos ante la desventaja del diámetro de partícula. Esto es, al presentar el mayor grado de hinchamiento, también será la muestra que en disolución acuosa (aunque es regulable con el pH de la solución) presente un diámetro de partícula hidrodinámico mayor. Al tener un diámetro hidrodinámico mayor, disminuye la posibilidad de utilizar las nanopartículas en inyecciones intravenosas, por lo cual será muy importante elegir la muestra adecuada con ambos factores (diámetro de partícula hidrodinámico a diferentes pHs y la

cantidad de fármaco retenida en la estructura).

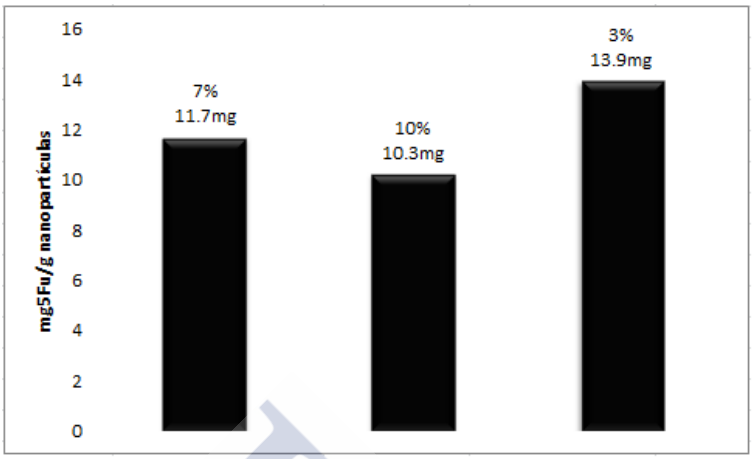


Figura 4.32. Cantidad de 5–FU atrapado en las nanopartículas, dependiendo del grado de entrecruzamiento de la muestra.

4.5.2.3. Cinéticas de liberación de 5–Fu medidas por UV–Vis.

Las cinéticas de liberación del 5–fluoracilo, se siguieron mediante la técnica de espectroscopia UV–Vis. Para realizar las mediciones, se pesaron 0,01 g de la muestra (nanopartículas), previamente cargada con el fármaco 5–Fu, y posteriormente se pusieron en contacto con 50 ml de agua MiliQ. Se tomaron las medidas cada 30 segundos durante un tiempo de 40 minutos, obteniéndose los valores de absorbancia a la longitud de onda de λ= 265nm, con los cuales, se calcularon los valores de concentración de fármaco liberada, utilizando la curva de calibrado de 5–FU (figura 4.29).

A partir de los resultados obtenidos, pudimos comprobar, que las nanopartículas son pH sensibles, y que por lo tanto, responden liberando el fármaco a pH ácido de ≈ 5,4 (valor de pH aproximado en el endosoma de las células cancerígenas), mientras que a un valor de pH de 7.4 (valor aproximado de pH en la sangre), la liberación es prácticamente nula.

A continuación, en la figura 4.33, se han representado los valores de

concentración de 5–FU liberada por las muestras M1 y M4, en donde claramente se muestra el efecto del pH antes mencionado. Para la muestra M1, se obtuvo una liberación de 5–Fu de hasta 3,4 ppm ($2{,}61 \cdot 10^{-5}$ M), mientras que a un pH de 7,4, la liberación máxima para dicha muestra fue de tan sólo 0,042 ppm ($3{,}23 \cdot 10^{-7}$ M).

La muestra M4, presentó la misma tendencia, obteniéndose valores de concentración liberada de 5,7 ppm ($4{,}382 \cdot 10^{-5}$ M) en un pH de 5,4 y de 1,21 ppm ($9{,}3510^{-6}$ M) a pH de 7,4.

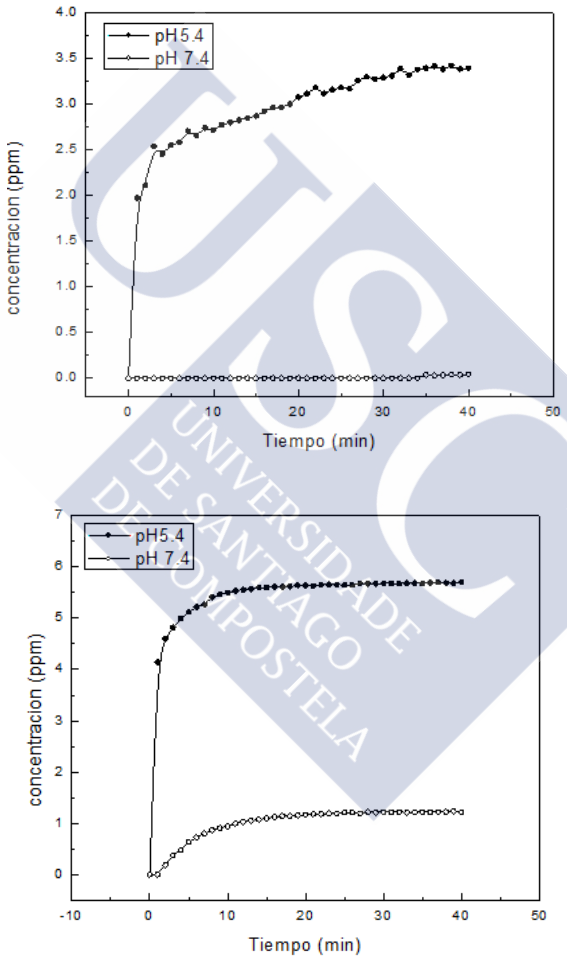


Figura 4.33. Cinéticas de liberación de 5–FU para las muestras M1 (arriba) y M4 (abajo) a pH de 5.4 y 7.4.

Con estos resultados, se comprueba, que las nanopartículas de poli(N–

isopropilacrilamida–co–metacrilato de 2 dietilamino etilo), podrían ser materiales potenciales para ser utilizados como sistemas liberadores de fármacos anticancerígenos.

4.5.2.4. Liberaciones de 5–Fluoracilo en función del grado de entrecruzamiento de la muestra.

Como discutimos anteriormente en esta memoria, el grado de entrecruzamiento de un hidrogel o nanohidrogel, es un factor determinante en la capacidad de hinchamiento de la muestra, como también en su capacidad de retención y liberación de moléculas disueltas en el medio acuoso de contacto. La liberación del 5–FU, presentó la misma tendencia. En la figura 4.34, se presentan los resultados obtenidos de la liberación a un pH de 5,4 para las muestras M1 y M4, siendo la muestra M1 la que contiene una mayor cantidad de agente entrecruzante (5%), mientras la muestra M4 contienen tan sólo un 3%.

La muestra M4, al tener una menor cantidad de agente entrecruzante, presenta también un mayor grado de hinchamiento en soluciones acuosas, lo cual le permitirá una mejor difusión tanto de entrada como de salida de las moléculas disueltas en la solución de contacto. Esto se puede comprobar con ambas muestras, en donde la muestra con menor grado de entrecruzamiento liberó 5,7 ppm ($4{,}38 \cdot 10^{-5}$ M), mientras que la muestra con mayor grado de entrecruzamiento, liberó una menor cantidad de fármaco 3,4 ppm ($2{,}61 \cdot 10^{-5}$ M), a un pH de 5,4.

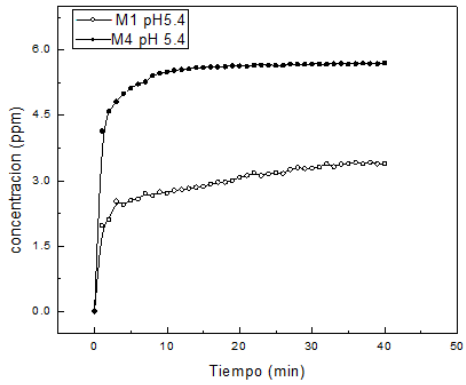


Figura 4.34. Cinéticas de liberación de 5–FU para las muestras M1 y M4 a pH de 5.4; comparación en función del grado de entrecruzamiento.

Todas las muestras (M1, M2, M3 y M4), entrecruzadas al 5, 7, 10 y 3 % respectivamente, presentaron esta misma tendencia, a mayor porcentaje de entrecruzamiento, menor cantidad de fármaco liberado.

En la figura 4.35 y en la tabla 4.17 se muestra la información correspondiente de las concentraciones liberadas para las muestras M1, M2, M3 y M4, en donde se puede observar que a un pH de 5,4, las muestras entrecruzadas al 3 y al 5%, han liberado el 100% de del fármaco que se encontraba retenido en la estructura del nanogel, mientras que la muestra M2 (que se encuentra entrecruzada a un 7%), solamente libera un 70% del fármaco y la muestra M3 entrecruzada a un 10%, es la muestra que liberó la menor cantidad, de tan sólo un 60% del 5–FU. Para el pH de 7,4 se obtuvieron los mismos resultados, liberando un 13,3, 10,9, 8,6, y 22% del fármaco retenido en la estructura las muestras M1, M2, M3 y M4, respectivamente.

Es importante considerar, que aun cuando la respuesta de hinchamiento a pH 7,4 es menor que a pH 5,4 (tal como se describe en la sección 4.2.10), a este pH, cierta cantidad del fármaco también es liberado, sin embargo, la cantidad liberada es mucho menor a la cantidad liberada al pH de 5,4, presentándose a este valor de pH una liberación máxima del 23% del fármaco.

Tabla 4.17. Concentraciones y porcentajes máximos liberadas de 5–Fu por las muestras M1, M2, M3 y M4 a pH 5,4 y 7,4.

Muestra	Entrecruzamiento (%)	pH de liberación	Concentración máxima liberada (ppm)	Concentración máxima liberada (M)	Liberación (%)
M1	5	5.4	3.4	$2.61E^{-5}$	100
M1	5	7.4	0.42	$3.26E^{-6}$	13,3
M2	7	5.4	2.93	$2.25E^{-5}$	70
M2	7	7.4	0.5	$3.9E^{-6}$	10,9
M3	10	5.4	2.48	$1.90E^{-5}$	60,8
M3	10	7.4	0.93	$6.61E^{-5}$	8,6
M4	3	5.4	5.7	$4.38E^{-5}$	100
M4	3	7.4	1.21	$9.35E^{-6}$	22

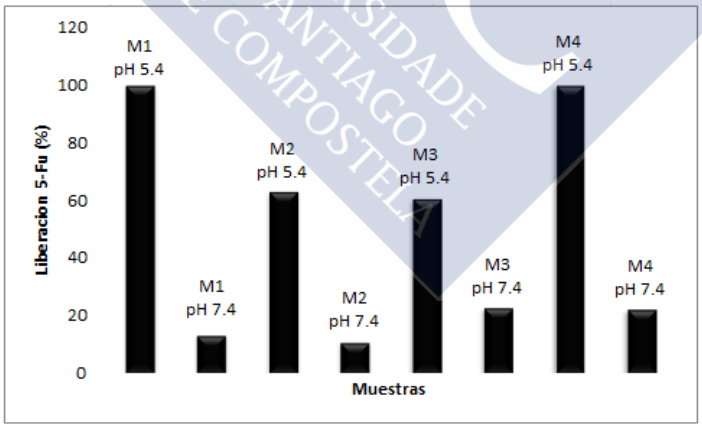


Figura 4.35. Porcentajes de liberación de 5–Fu para las muestras M1, M2, M3 y M4 a pH 5,4 y 7,4.

4.5.2.5. Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–FU dependiendo de la composición de alimentación de los monómeros (NIPA y DEA).

Anteriormente, en la sección 4.2.1, se describió que la síntesis de las nanopartículas de poli(N–isopropilacrilamida–co–metacrilato de 2 dimetil amino etilo) fueron variadas tanto en la composición de agente entrecruzante (NMBA) tanto como en la composición de alimentación inicial de los monómeros; para tener diversas muestras y poder así estudiar los efectos que estas variantes pudieran generar.

Para determinar si la alimentación inicial de los monómeros es un factor importante para la retención y posterior liberación del fármaco 5–Fu a través de las nanopartículas, se seleccionaron cuatro muestras con distintas composiciones monoméricas, pero sin variar la composición de agente entrecruzante. Estas muestras contenían las siguientes composiciones monoméricas: 95:5, 20:80, 30:70 y 40:60 de NIPA y DEA respectivamente.

En la figura 4.36 se muestran los resultados de encapsulación del fármaco para las muestras anteriormente mencionadas. Se observa una tendencia de mayor encapsulación de 5–Fu cuando la concentración del monómero DEA también es mayor en la muestra; la muestra M12 con una composición de alimentación de 20% de NIPA y 80% de DEA, es la que presenta la mayor retención de 5–FU (20,8 $mg \cdot g^{-1}$ nanopartículas). Las muestras M13 y M14 presentaron una retención muy similar de 15,7 y 15,9 $mg \cdot g^{-1}$ de nanopartículas respectivamente. Sin embargo, la muestra M1 que tan sólo tiene una composición inicial de 5% de DEA, retiene una cantidad mucho menor del fármaco, con tan sólo 8 $mg \cdot g^{-1}$ de nanopartículas.

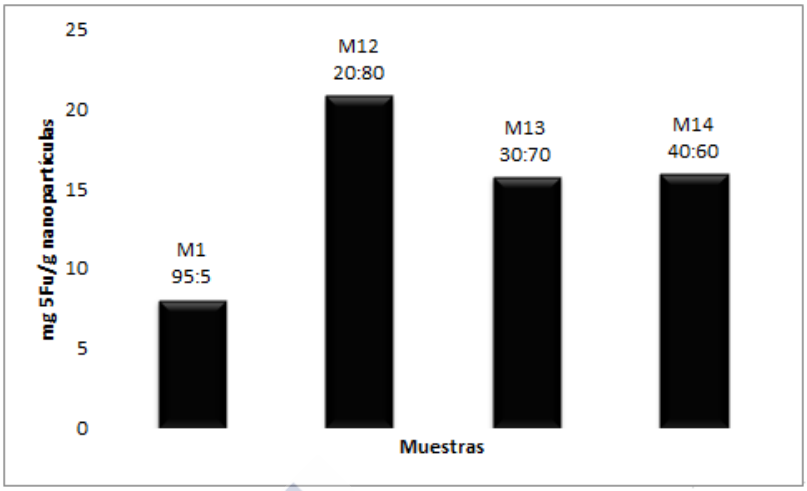


Figura 4.36. Cantidad de 5–Fu atrapado en las nanopartículas, dependiendo de la composición monomérica en la muestra.

4.5.2.6. Liberaciones de 5–Fluoracilo dependiendo de la composición de alimentación de los monómeros (NIPA y DEA).

En el apartado anterior describimos como la composición inicial de los monómeros en la síntesis de las nanopartículas, tendrá un efecto considerable en la encapsulación del fármaco 5–Fu en la red entrecruzada de los hidrogeles. Por lo que, se realizaron las pruebas correspondientes para las muestras M1 (NIPA95:5DEA) y M12 (NIPA20:80DEA), ambas entrecruzadas al 5% con NMBA y así podríamos comprobar si el efecto de mayor encapsulación se corresponde con una mayor liberación en el medio, al pH correspondiente.

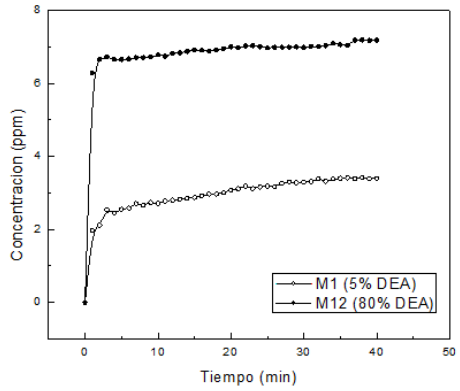


Figura 4.37. Cinéticas de liberación de 5–FU para las muestras M1 y M12 a pH de 5,4, comparación respecto a la composición de alimentación de los monómeros NIPA y DEA.

En la figura 4.37 puede observarse que los resultados de liberación se corresponden con los resultados de encapsulación de 5–Fu, en donde la muestra que contienen una mayor cantidad del monómero DEA (M12) (que también presentó una mayor encapsulación del fármaco en su estructura (20,8 $mg \cdot g^{-1}$ nanopartículas) en comparación con la muestra M1 (8,03 $mg \cdot g^{-1}$ nanopartículas)), presentó una liberación mucho mayor en comparación con la muestra M1. Este efecto se atribuye a que el porcentaje de hinchamiento en las nanopartículas, aumenta cuando la composición del monómero DEA también aumenta, debido a que la hidrofilicidad es mayor por la presencia del monómero ionizable.

4.5.3. Nanopartículas Sintetizadas por polimerización en nanoprecipitación.

4.5.3.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–FU dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución.

La tabla 4.18 presenta las concentraciones iniciales y finales de las

soluciones preparadas de 5–FU para determinar si la concentración inicial de las soluciones de 5–FU interfiere en la cantidad de fármaco que se retiene en las nanopartículas. En esta misma tabla se presentan los resultados obtenidos de la carga de 5–FU en las nanopartículas tanto en molaridad como en ppm. Las concentraciones teóricas fueron las mismas que se seleccionaron para las muestras por polimerización en microemulsión ($1{,}0\cdot10^{-3}$ $^{-3,}$ $2{,}5\cdot10^{-3}$ y $4{,}5\cdot10^{-3}$ M). La muestra seleccionada fue la N8, ya que es la muestra que corresponde a la misma composición monomérica y grado de entrecruzamiento que la muestra M1 (muestra seleccionada para realizar esta misma prueba en microemulsión (sección 4.4.3.1).

Los porcentajes de 5–FU retenidos en las nanopartículas se calcularon a partir de los datos de la tabla 4.18, restando la concentración de la solución final a la concentración de la solución inicial (considerando ésta como el 100%). Los resultados se muestran en la figura 4.38. Los nanogeles retienen un 11,54, 5,64 y 12% del fármaco, cuando la concentración inicial es de 1, 2,5, y $4{,}5\cdot10^{-3}$ M respectivamente; siendo igual a 20,56, 21,44, y 70,02 ppm, respectivamente.

Tabla 4.18. Valores de las concentraciones en las soluciones iniciales y finales de 5–FU valoradas por UV–VIS.

	Concentraciones					
Muestra	inicial teórica M	Inicial real calculada (M)	Inicial (ppm)	final M	final ppm	ppm en el nanogel
N8	$1{,}0E^{-3}$	$1{,}37E^{-3}$	178,01	$1{,}21E^{-3}$	157,4	20,5
N8	$2{,}5E^{-3}$	$2{,}87E^{-3}$	374,0	$2{,}75E^{-3}$	358,3	21,4
N8	$4{,}5E^{-3}$	$4{,}02E^{-3}$	583,3	$3{,}94E^{-3}$	513,2	70,0

.

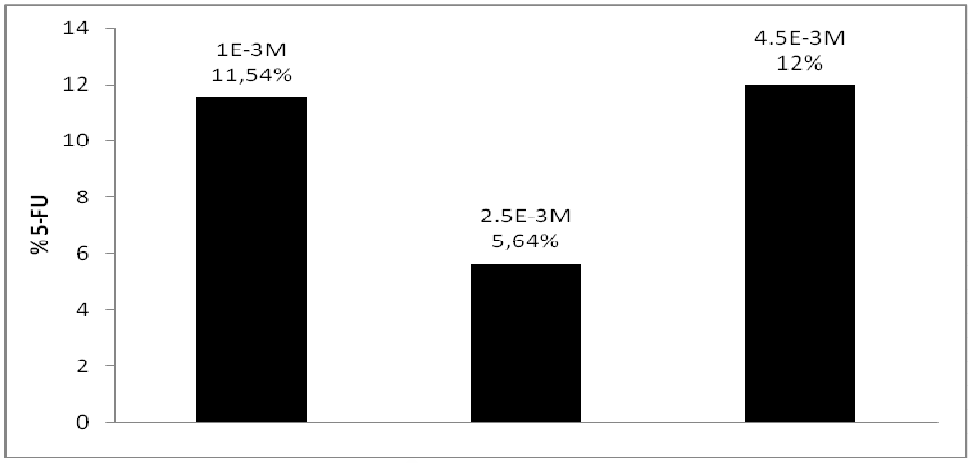


Figura 4.38. Porcentaje de 5–FU atrapado en las nanopartículas, en base a la concentración de la solución inicial para la muestra N8.

En la figura 4.39 se muestran los resultados del 5–FU retenido en las nanopartículas, expresado en unidades de mg de 5–FU $\cdot g^{-1}$ de nanogeles, utilizando la ecuación 4.3. Puede observarse que a bajas concentraciones de 5–FU, la cantidad retenida por las nanopartículas es similar, cuando la concentración se aumenta considerablemente, se retiene en la muestra una mayor cantidad de fármaco.

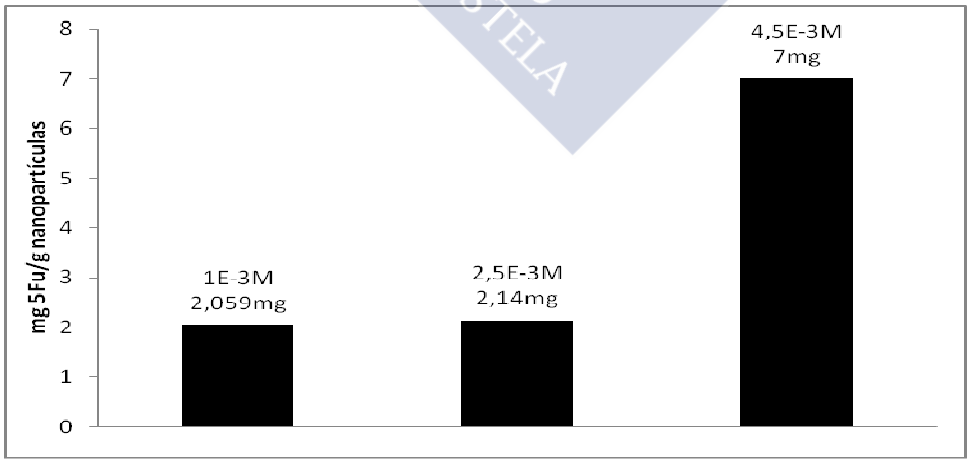


Figura 4.39. 5–FU retenido en las nanopartículas, representado en mg$\cdot g^{-1}$ *de nanopartículas para la muestra N8.*

4.5.3.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–FU dependiendo del grado de entrecruzamiento de las nanopartículas.

En la figura 4.40 se muestra la capacidad de las nanopartículas para retener el 5–FU en su estructura en función del porcentaje de entrecruzamiento de la muestra. Las muestras seleccionadas fueron las de composición de NIPA 95:5 DEA, con porcentajes de entrecruzante de 30,8, 20 y 5% (muestras N4, N6 y N8).

Los resultados obtenidos nos muestran que la cantidad 5–FU retenido en las nanopartículas disminuye conforme aumenta el grado de entrecruzamiento en la muestra. Esto se debe a que a mayor grado de entrecruzamiento el hinchamiento de las partículas es menor y la difusión de entrada y salida del soluto (fármaco) al interior de la red está mayormente impedida.

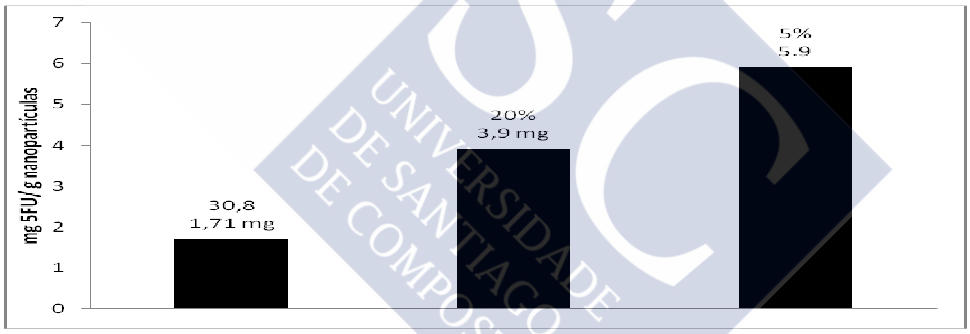


Figura 4.40. Cantidad de 5–FU atrapado en las nanopartículas, dependiendo del grado de entrecruzamiento de la muestra.

4.5.3.3. Cinéticas de liberación de 5–Fu medidas por UV–Vis.

En la figura 4.41, se muestran las cinéticas de liberación para el fármaco 5–FU a dos diferentes pH en la muestra N8. Esta muestra presenta una liberación del 100% del fluoracilo retenido en la estructura del nanogel a un pH de 5,4. Cuando el pH se aumenta a 7,4, el valor de la concentración liberada es sólo de un 4,6%.

Estos resultados nos indican que las muestras sintetizadas por polimerización en nanoprecipitación, son adecuadas para la liberación del 5–Fluoracilo.

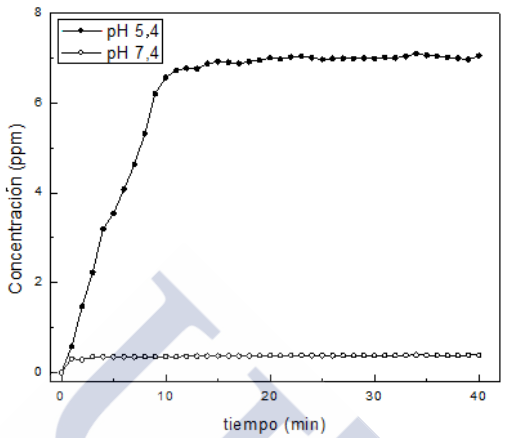


Figura 4.41. Cinéticas de liberación de 5–FU para la muestra N8 a pH de 5,4 y 7,4.

4.5.3.4. Liberaciones de 5–Fluoracilo en función del grado de entrecruzamiento de la muestra.

En la figura 4.42, se presentan los resultados obtenidos de la liberación a un pH de 5,4 para las muestras N8 y N6, siendo la muestra N8 la que contiene una menor cantidad de agente entrecruzante (5%), mientras la muestra N6 contienen un 20%.

El mayor grado de hinchamiento lo presenta la muestra N8, por lo que en la figura puede observarse que la concentración de fármaco liberada es mayor con respecto a la muestra N6.

Por su parte, la tabla 4.19 muestra los resultados de las concentraciones máximas liberadas para las tres diferentes muestras sintetizadas con diferente grado de entrecruzamiento pero la composición monomérica de NIPA 95:5 DEA constante (N4, N6 y N8).

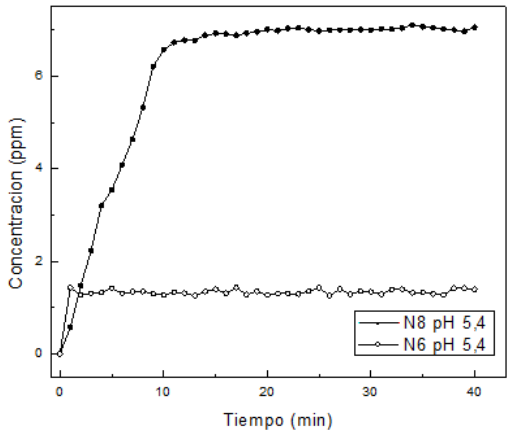


Figura 4.42. Cinéticas de liberación de 5–FU para la muestra N8 y N6 a pH de 5,4. Comparación de la liberación en función del grado de entrecruzamiento.

Tabla 4.19. Concentraciones y porcentajes máximos liberadas de 5–Fu por las muestras N4, N6, y N8 a pH 5,4 y 7,4.

Muestra	Entrecruzamiento (%)	pH de liberación	Concentración máxima liberada (ppm)	Concentración máxima liberada (M)	Liberación (%)
N4	30,8	5,4	0,95	$7{,}31E^{-6}$	10,6
N4	30,8	7,4	0,11	$8{,}45E^{-7}$	1,22
N6	20	5,4	1,4	$1{,}72E^{-5}$	34,3
N6	20	7,4	0,15	$1.16E^{-6}$	3,6
N8	5	5,4	7,05	$5{,}4E^{-5}$	100
N8	5	7,4	0,38	$2.92E^{-6}$	4,6

4.6. Terfenadina.

La histamina es una amina biogénica que regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos, a través de la activación de receptores específicos (H1, H2, H3 y H4) *(Parsons y Ganellin, 2006)*.

Algunos autores han reportado que la histamina estimula el crecimiento de

células tumorales del tipo melanoma, mientras que su receptor antagonista H1 induce apoptosis (muerte celular) en diversas líneas celulares humanas de este tipo (*Jangi et al., 2006 y 2008)*. Algunos otros reportes prueban la actividad antitumoral del receptor H1 de la histamina en células tumorales humanas del tipo leucemia, mieloma (*Jangi et al., 2004; Mao et al., 2008*), colon e hígado (*Liu et al., 2003*).

La terfenadina es un potente receptor antagonista H1 de la histamina, por lo que ha sido utilizada en la exploración de las vías moleculares implicadas en la apoptosis inducida por antihistamínicos del tipo H1 (*Simons, 2004*), encontrándose que actúa al inducir daño en el ADN así como en las proteínas captasas-2-dependientes, que son proteínas reguladoras de la apoptosis celular (*Jangi et al., 2006*). Por otra parte, estos efectos son consecuencia de un aumento del Ca^{+2} citosólico, inducido dependientemente de la dosis del tratamiento con terfenadina (*Jangi et al., 2008*), siendo el Ca^{+2} uno de los principales reguladores de la apoptosis.

Por estas razones, la terfenadina es un fármaco interesante para su estudio en células tumorales, por lo que ha sido uno de los fármacos seleccionados para ser cargados y liberados por los nanogeles de NIPA-co-DEA sintetizados.

La estructura molecular de la terfenadina se muestra en la figura 4.43.

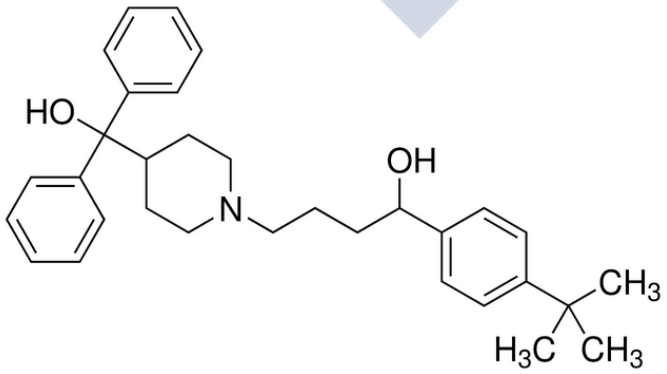


Figura 4.43. Estructura química de la terfenadina.

4.6.1. Selección de la longitud de onda (λ) de absorción de la terfenadina y curva de calibrado.

Para determinar la longitud de onda correspondiente al pico máximo de absorción de la terfenadina por ultravioleta visible, se realizaron estándares con diferentes concentraciones (1, 2, 2,5, 3 y 3,5 M), realizándose diversos escaneos de las disoluciones, a diferentes longitudes de onda, que iban desde los 400 a los 240 nm.

En la tabla 4.20 se presentan las concentraciones utilizadas para dicha prueba, en ppm y en moles por litro. También los gramos de fármaco utilizados por cada 100ml de agua miliQ.

Una vez realizados estos barridos, se determinó que el punto máximo de absorción de la terfenadina se presentó a una longitud de onda λ = 259 nm, lo cual corresponde a la longitud de onda reportada por otros autores.

En la figura 4.44 se presentan los valores de absorbancia tomados a cada longitud de onda desde los 400 a los 240 nm. En esta imagen se puede apreciar que desde los 400 a los 280 nm, la terfenadina no presenta una absorción considerable, mientras que a partir de los 280 nm comienza a presentar un aumento en el valor de absorbatividad molar, hasta alcanzar el punto máximo a la longitud de 259 nm, como ya se había comentado anteriormente. Por lo tanto, esta longitud de onda fue seleccionada para realizar los experimentos de encapsulación y liberación del fármaco.

Tabla 4.20. Concentraciones de terfenadina utilizadas para la realización de la curva de calibrado y la determinación del pico máximo de absorción por UV-VIS.

Concentración (ppm)	**Concentración (mol/L)**	**mg terf/ 100ml agua**
471,67	$1E^{-3}$	47,167
943,34	$2E^{-3}$	94,3
1179,17	$2{,}5E^{-3}$	117,9
1415	$3E^{-3}$	141,5
1650,8	$3{,}5E^{-3}$	165

Para obtener la ecuación de la recta que nos permitió calcular las concentraciones de fármaco tanto encapsulado como liberado por las nanopartículas, se procedió a graficar el valor de absorbancia obtenido en el punto máximo de absorción de la terfenadina (λ = 259 nm) para cada una de las concentraciones anteriores, tal como se muestra en la figura 4.45.

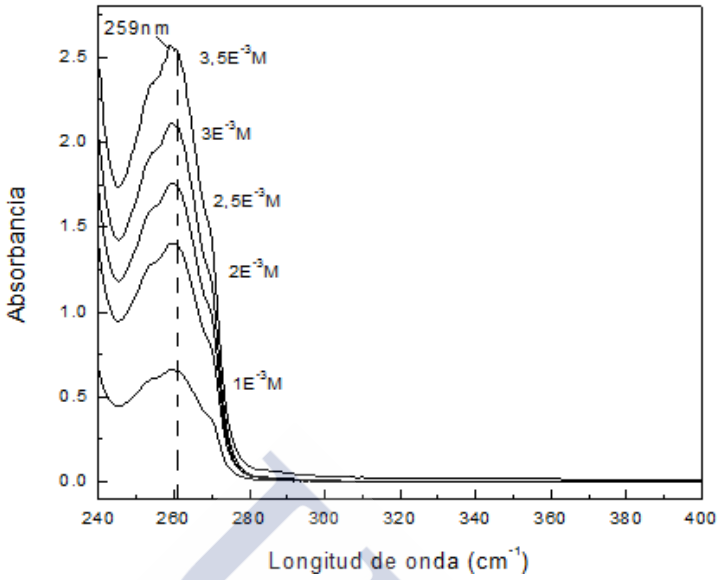


Figura 4.44. Determinación del pico máximo de absorción de la terfenadina por UV-VIS.

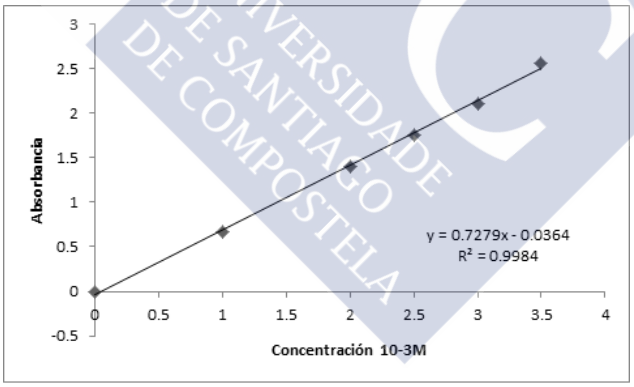


Figura 4.45. Curva de calibración de la terfenadina por UV-Vis y su respectiva ecuación de la recta.

Los valores de absorbancia correspondientes al punto máximo de absorción de la terfenadina (longitud de onda λ = 259 nm) se muestran en la tabla 4.21.

Antes de comenzar el siguiente apartado, es importante resaltar que, la

ecuación de la recta obtenida en nuestra curva de calibrado presenta una tendencia prácticamente lineal, presentando un valor de R^2 = 0.9984, por lo que se puede aplicar perfectamente la ley de Lambert-Beer para realizar los cálculos correspondientes.

Tabla 4.21. Valores de absorbancia de la terfenadina en el punto máximo de absorción por ultravioleta visible (UV-VIS).

Concentración (10^{-3}M)	**Absorbancia**
0	0
1	0,664
2	1,40446
2,5	1,76305
3	2,11505
3,5	2,5697

4.6.2. Nanopartículas sintetizadas por polimerización en microemulsión y en nanoprecipitación.

4.6.2.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación de la terfenadina dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución.

La elección de la concentración de terfenadina elegida para cargar los nanogeles de NIPA-co-DEA se llevó a cabo preparando soluciones del fármaco con

diferentes concentraciones iniciales, aumentando cada vez, y así determinar si la concentración inicial interferirá en la cantidad de fármaco internalizada en la red polimérica. Este procedimiento se realizó tanto para las muestras sintetizadas por microemulsión como para las sintetizadas por nanoprecipitación.

En la tabla 4.22 se presentan las concentraciones iniciales y finales de las soluciones de terfenadina, así como la cantidad de fármaco que quedó encapsulada en cada muestra.

Tabla 4.22. Valores de las concentraciones en las soluciones iniciales y finales de terfenadina valoradas por UV-VIS.

	Concentraciones					
Muestra	inicial teórica (M)	Inicial real calculada (M)	Inicial (ppm)	final (M)	final (ppm)	ppm en el nanogel
M1	$1{\cdot}10^{-3}$	$9{,}8{\cdot}10^{-4}$	462,7	$8{,}65{\cdot}10^{-4}$	407,9	54,8
M1	$2{,}5{\cdot}10^{-3}$	$2{,}3{\cdot}10^{-3}$	1.081,6	$7{,}83{\cdot}10^{-3}$	1.018,7	62,3
M1	$4{,}5{\cdot}10^{-3}$	$4{,}46{\cdot}10^{-3}$	2.106,7	$4{,}31{\cdot}10^{-3}$	2.036,4	69,6
N8	$1{\cdot}10^{-3}$	$1{,}03{\cdot}10^{-3}$	485,9	$9{,}76{\cdot}10^{-3}$	460,3	25,6
N8	$2{,}5{\cdot}10^{-3}$	$8{,}6{\cdot}10^{-3}$	1117,6	$2{,}75{\cdot}10^{-3}$	1.090	27,6
N8	$4{,}5{\cdot}10^{-3}$	$4{,}48{\cdot}10^{-3}$	2115,8	$4{,}36{\cdot}10^{-3}$	2.058,4	57,4

La concentración (en ppm) de terfenadina que se ha retenido en los nanogeles presenta dos diferentes secuencias. Primeramente, la muestra M1 (NIPA 95:5 DEA y 5% NMBA) en todas las concentraciones retiene una mayor cantidad de

terfenadina que la muestra N8 (misma composición monomérica que M1). Esto es, la muestra sintetizada por microemulsión al presentar un diámetro de partícula hidrodinámico mayor que la muestra N8, permite más fácilmente la entrada del fármaco en la estructura del nanogel. En segundo lugar, puede observarse que a medida que aumenta la concentración inicial del fármaco, también aumenta la cantidad del mismo retenido en las nanopartículas. Estas tendencias se representan gráficamente en la figura 4.46.

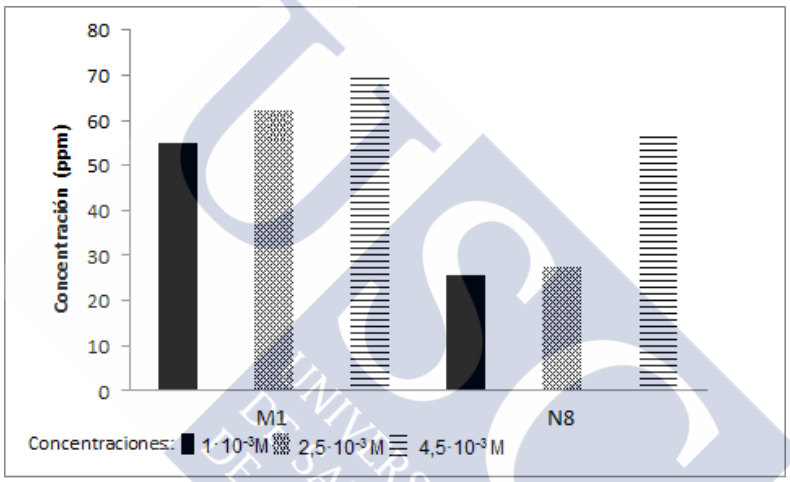


Figura 4.46. Concentraciones de terfenadina retenidas en las muestras M1 y N8 a diferentes concentraciones de la solución inicial de contacto.

Otro aspecto importante a destacar, es que la cantidad de terfenadina retenida en las nanopartículas, es menor a la cantidad de 5–Fu retenida para la misma muestra. Esto podría explicarse por las solubilidades de ambos fármacos. El 5–Fu es completamente soluble en agua, mientras que la terfenadina es insoluble. La carga de los nanogeles con terfenadina se realizó utilizando como medio disolvente el etanol. Los nanogeles no presentan tanta afinidad por el etanol, por ser un disolvente orgánico y la red entrecruzada de las nanopartículas no hinchará como en medio acuoso, lo que se traduce en un menor paso de partículas de fármaco al interior de las nanopartículas.

La concentración inicial utilizada para seguir las cinéticas de liberación de terfenadina será la de $4{,}5 \cdot 10^{-3}$ M.

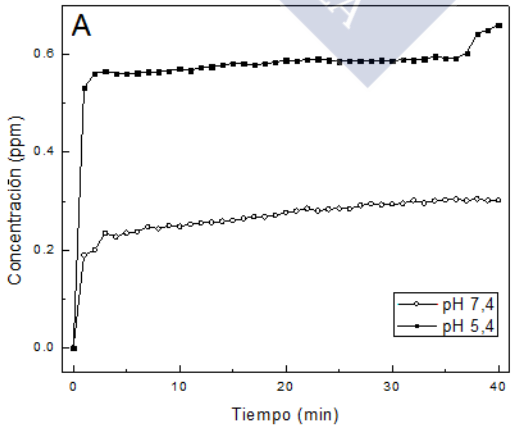
4.6.2.2. Cinéticas de liberación de terfenadina medidas por UV–Vis.

La cinética de liberación de la terfenadina a través de las muestras M1 y N8 fue seguida por ultravioleta visible (UV–Vis) a pH 5,4 y 7,4.

En la figura 4.47 se muestran las cinéticas de liberación para ambas muestras, en donde puede observarse una mayor liberación a pH de 5,4. Sin embargo, al pH de 7,4 también existe cierta liberación del fármaco aunque en menor cantidad que al otro pH.

La muestra M1 presenta una liberación máxima de un 16% de la terfenadina que se encontraba en el interior de las nanopartículas, a pH de 5,4. Liberando un 7,4%, cuando se aumentó el pH a 7,4.

La muestra N8, que tiene un diámetro de partícula hidrodinámico menor que la muestra M1, liberó solamente un 12,7% de la terfenadina retenida cuando el pH de liberación fue de 5,4. Cuando el pH de liberación fue de 7,4, la liberación correspondió a solamente a un 3,4% del fármaco.



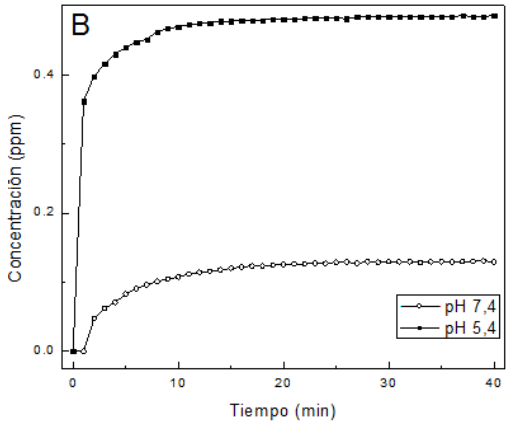


Figura 4.47. Cinéticas de liberación de terfenadina a pH de 5,4 y 7,4 para las muestras (A) M1 y (B) N8.

4.7. Liberaciones con doble fármaco.

La incorporación de dos tipos diferentes de fármacos en un mismo vehículo de transporte es uno de los futuros retos para los sistemas liberadores de fármaco del tipo "inteligentes". Esto con el fin de optimizar los efectos correspondientes a cada uno de los fármacos, utilizándose la concentración optima de cada uno de ellos y en diferentes periodos de tiempo. Uno de los principales retos de la terapia combinada es el control del comportamiento de liberación de cada uno de los medicamentos en forma independiente, por lo cual se ha estudiado la liberación de dos fármacos a través de un solo transportador (*Castro et al., 2012*).

Recientemente, la terapia que combina dos fármacos con efectos terapéuticos distintos, ha mostrado ser una forma efectiva para tratar diversas enfermedades. Siendo esta la principal razón para que estudiásemos la incorporación y liberación de dobles fármacos en la red polimérica entrecruzada de las nanopartículas sintetizadas.

4.7.1. 5–Fluoracilo y metformina.

El tercer fármaco seleccionado en este proyecto de investigación fue la

metformina. Este medicamento es un antiglicemiante, utilizado de forma oral para el tratamiento de la diabetes mellitus, siendo eficaz en el control de los niveles de glucosa en sangre.

Existen evidencias que indican que una de las perturbaciones metabólicas de las células que inducen a la carcinogénesis es, principalmente la glucólisis aeróbica (*Kroemer y Pouyssegur, 2008*). En base a este principio, sobre la base de las características epidemiológicas, de los datos preclínicos y clínicos, la metformina se convirtió en uno de los fármacos más atractivos y prometedores destinados para el metabolismo del cáncer. Aun cuando su mecanismo de acción no ha sido completamente aclarado, este fármaco ha demostrado inhibir un complejo de la cadena respiratoria intracelular, lo cual se traduce en una muerte celular (*El-Mir et. al, 2000*).

En la figura 4.48 se muestra la estructura molecular del clorhidrato de metformina, el cual es el producto comercial.

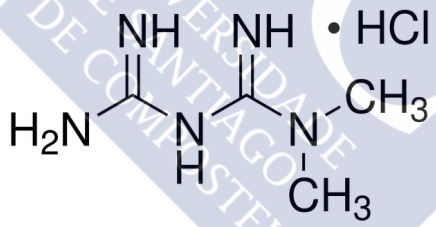


Figura 4.48. Estructura química del clorhidrato de metformina.

4.7.1.1. Selección de la longitud de onda (λ) de absorción de la metformina y curva de calibrado.

Para determinar la longitud de onda correspondiente al pico máximo de absorción de la metformina por ultravioleta visible, se realizaron estándares con diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20 y 30 ppm), realizándose diversos escaneos de las disoluciones, a diferentes longitudes de onda, que iban desde los 500 a los

200 nm. Una vez realizados estos barridos, se determinó que el punto máximo de absorción de la terfenadina se presentó a una longitud de onda λ = 232 nm.

En la tabla 4.23 se presentan las concentraciones utilizadas para dicha prueba, en ppm y en moles por litro. También los gramos de fármaco utilizados por cada 100ml de agua miliQ.

Tabla 4.23. Concentraciones de metformina utilizadas para la realización de la curva de calibrado y la determinación del pico máximo de absorción por UV-VIS.

Concentración (ppm)	**Concentración ($mol \cdot L^{-1}$)**	**mg terf/ 100 ml agua**
5	$3{,}02 \cdot 10^{-5}$	0,5
10	$6{,}04 \cdot 10^{-5}$	1
15	$9{,}05 \cdot 10^{-5}$	1,5
20	$1{,}20 \cdot 10^{-4}$	2
30	$1{,}81 \cdot 10^{-4}$	2,5

En la figura 4.49 se representan los valores de absorbancia tomados a cada longitud de onda desde los 500 a los 200 nm. En esta imagen se puede apreciar que desde los 500 a los 200 nm, la metformina no presenta una absorción considerable, sin embargo, a partir de los 260 nm comienza a presentar un aumento en el valor de absorbatividad molar, hasta alcanzar el punto máximo a la longitud de 232 nm. Por lo tanto, esta longitud de onda fue seleccionada para realizar los experimentos de encapsulación y liberación del fármaco.

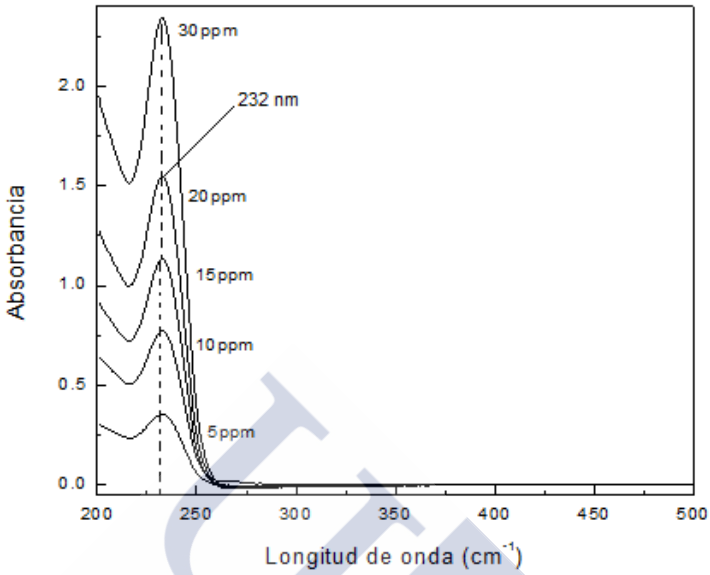


Figura 4.49. Determinación del pico máximo de absorción de la metformina por ultravioleta visible (UV-VIS).

Para obtener la ecuación de la recta que nos permitió calcular las concentraciones de fármaco tanto encapsulado como liberado por las nanopartículas, se procedió a graficar el valor de absorbancia obtenido en el punto máximo de absorción de la metformina (λ = 232 nm) para cada una de las concentraciones anteriores, tal como se muestra en la figura 4.50.

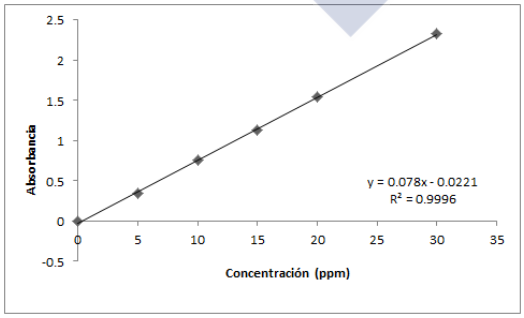


Figura 4.50. Curva de calibración de la metformina por UV-Vis y su respectiva ecuación de la recta.

Los valores de absorbancia correspondientes al punto máximo de absorción de la metformina (longitud de onda λ = 232 nm) se muestran en la tabla 4.24.

Tabla 4.24. Valores de absorbancia de la metformina en el punto máximo de absorción por ultravioleta visible (UV-VIS).

Concentración ppm	**Absorbancia**
0	0
5	0,3509
10	0,76259
15	1,1254
20	1,5421
30	2,33031

Antes de comenzar el siguiente apartado, es importante resaltar que, la ecuación de la recta obtenida en nuestra curva de calibrado presenta una tendencia prácticamente lineal, presentando un valor de R^2 = 0,9996, por lo que se puede aplicar perfectamente la ley de Lambert-Beer para realizar los cálculos correspondientes.

Para cuantificar la cantidad de 5–Fu retenido en las nanopartículas, se utilizó la curva de calibrado y la longitud de onda determinadas para este fármaco en la sección 4.4.2.

4.7.1.2. Nanopartículas sintetizadas por polimerización en microemulsión y en nanoprecipitación.

4.7.1.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación del 5–Fu y de la metformina dependiendo de la concentración inicial del fármaco en la solución.

Para introducir dos fármacos en el mismo vehículo de transporte, se prepararon soluciones con relaciones equimolares de ambos fármacos. En este caso, se seleccionaron el 5–Fu y la metformina, primero por su eficiencia en el tratamiento contra el cáncer y en segundo lugar porque ambos fármacos son solubles en agua y por lo tanto, puede utilizarse el mismo método de carga.

Se prepararon tres diferentes soluciones de fluoracilo y metformina. Todas con concentraciones equimolares de ambos fármacos. Con esto podríamos observar la tendencia de encapsulación en los nanogeles cuando ambos fármacos se encuentran compitiendo por un sitio en la red entrecruzada de las nanopartículas. Las concentraciones fueron de 1, 2,5, y $4{,}5 \cdot 10^{-3}$ M. Este procedimiento se realizó tanto para las muestras sintetizadas por microemulsión como para las sintetizadas por nanoprecipitación.

En la tabla 4.25 se presentan las concentraciones iniciales y finales de las soluciones con ambos fármacos, así como la cantidad de ellos que quedó encapsulada en cada muestra.

Las concentraciones de ambos fármacos que se retienen en las nanopartículas siguen las siguientes secuencias. Primeramente, a medida que aumenta considerablemente la concentración inicial de los fármacos, también aumenta la cantidad de fármaco retenida en las muestras; efecto que se ha visto para los otros fármacos en las secciones anteriores. En segundo lugar, a pesar de tener una solución equimolar de ambos monómeros, la concentración de 5–Fu

retenida en las nanopartículas, es mayor que la concentración de metformina que se adentra también en la red.

Tabla 4.25. Valores de las concentraciones en las soluciones iniciales y finales de 5–FU y metformina valoradas por UV–VIS.

	Concentraciones de 5–Fu					**Concentraciones de metformina**				
Muestra	Inicial teórica M	Inicial real calculada M	Inicial real ppm	Final ppm	ppm en el nanogel	Inicial teórica $M \cdot 10^3$	Inic. real calculada M	Inicial real ppm	Final ppm	ppm en el gel
M1	$1 \cdot 10^{-3}$	$9{,}8 \cdot 10^{-4}$	128,6	113,14	15,46	1,0	$9{,}7 \cdot 10^{-4}$	160,4	152,1	8,3
M1	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	$2{,}4 \cdot 10^{-3}$	308,7	288,83	19,87	2,5	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	409,6	400,1	9,5
M1	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	$5{,}7 \cdot 10^{-3}$	582,6	512	70,6	4,5	$4{,}4 \cdot 10^{-3}$	736,8	697,3	39,5
N8	$1 \cdot 10^{-3}$	$4{,}6 \cdot 10^{-4}$	124,7	112,86	11,84	1,0	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$	163,6	156,9	6,7
N8	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	$5{,}2 \cdot 10^{-4}$	318,9	309,25	9,65	2,5	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	412,8	408,5	4,3
N8	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	$2{,}9 \cdot 10^{-3}$	579,8	522,5	57,3	4,5	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	743,7	716,8	26,9

En base a la concentración inicial de cada uno de los fármacos (considerándola como el 100%), se calcularon los porcentajes de fármaco retenido en las nanopartículas. Estos resultados se muestran en la figura 4.51, en donde puede apreciarse claramente que el 5–Fu es prioritariamente encapsulado por las nanopartículas y que aunque los mayores porcentajes de fármaco encapsulado lo presentan la muestra M1 para la concentración de $1 \cdot 10^{-3}$ M, en realidad, cuando la concentración es de $4{,}5 \cdot 10^{-3}$ M, son más las ppm que se quedan retenidas en las muestras.

La concentración estudiada para las liberaciones de ambos fármacos fue la de $4{,}5 \cdot 10^{-3}$, ya que es con la cual se retiene una mayor concentración en ppm de los fármacos en las nanopartículas.

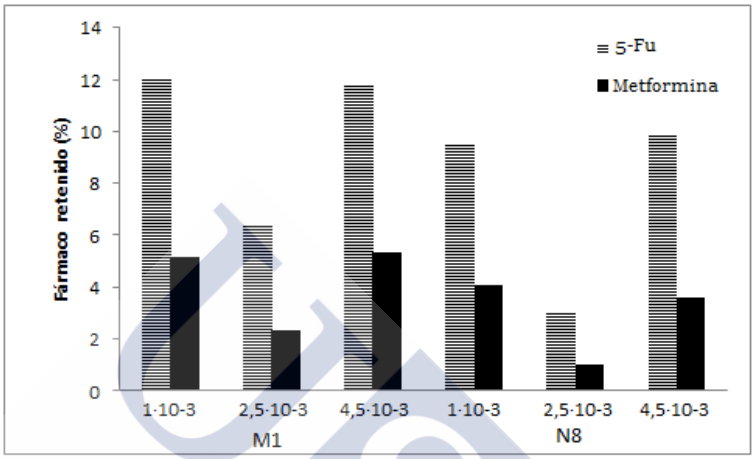


Figura 4.51. Porcentajes de 5–Fu y metformina *retenidos por las muestras M1 y N8 a diferentes concentraciones de la solución inicial de contacto.*

4.7.1.4. Cinéticas de liberación de 5–Fu y de metformina.

Las cinéticas de liberación con doble fármaco de 5–Fu y metformina a través de las muestras M1 y N8 se siguió por ultravioleta visible (UV–Vis) a pH 5,4 y 7,4.

En la figura 4.52, se muestran las cinéticas de liberación para ambas muestras, la imagen A corresponde a la liberación de ambos fármacos para los 2 pH a través de la muestra M1 y la imagen b corresponde para la muestra N8. En ambos gráficos se pueden observar dos efectos. Primeramente, como es de esperarse, se obtiene una liberación de mayor concentración de ambos fármacos cuando el pH de liberación es de 5,4. Sin embargo, al pH de 7,4 también existe cierta liberación del fármaco aunque en menor cantidad que a 5,4. El segundo efecto, es que la metformina se libera en menor proporción que el 5–Fu, aun considerando que también se retuvo una menor cantidad de este fármaco en la red

polimérica.

La muestra M1 presenta una liberación máxima del 89,8% de 5-Fu cuando el pH de la solución es igual a 5,4. Una vez que se aumentó el pH a 7,4, la liberación del mismo fármaco correspondió a un 9,7%. Por otra parte, la metformina se liberó en un 48,8% a pH de 5,4. Mientras que a pH de 7,4 solamente libera un 4%.

La muestra N8 presenta una liberación del 79,8 y del 8,1% para el fármaco 5-Fu, cuando el pH es de 5,4 y 7,4 respectivamente. La metformina, se libera en una menor proporción, liberándose solo un 38,9% cuando el pH es de 5,4 y de 3,67 cuando el pH aumenta hasta 7,4.

La menor liberación de la metformina en comparación con el 5-Fu podría atribuirse a que la solubilidad de dicho fármaco es menor que la del fluoracilo. El fluoracilo presenta una solubilidad de 12 $mg \cdot mL^{-1}$ (20°C), mientras que la metformina es soluble solamente a 0,285 $mg \cdot mL^{-1}$ (20°C).

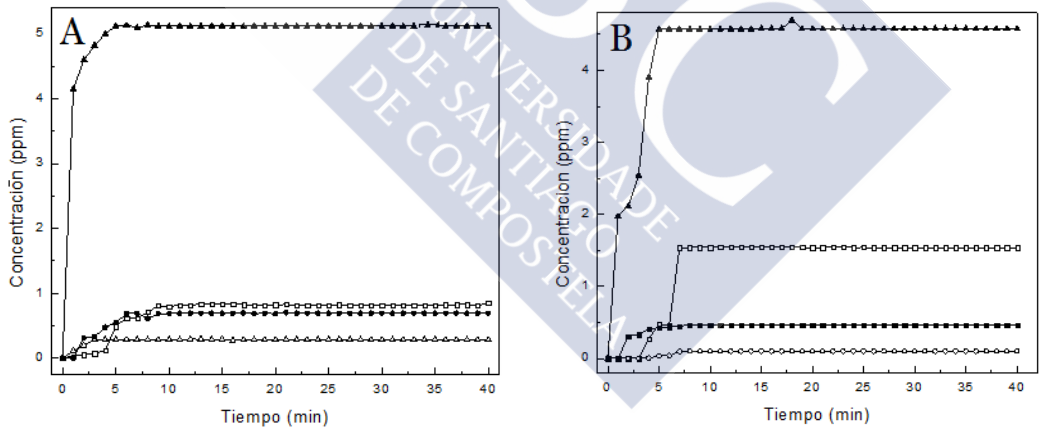


Figura 4.52. Liberaciones de 5-Fu y metformina. (A) Muestra M1: ▲= 5-Fu, pH 5,4; ● = 5-Fu, pH 7,4; □ = metf, pH 5,4; Δ = metf pH 7,4. (B): ▲= 5-Fu, pH 5,4; ■ =5-Fu, pH 7,4; □ = metf, pH 5,4; ○ = metf, pH 7,4.

4.8. Estrategia de funcionalización con el ligando ácido fólico.

La falta de especificidad de la quimioterapia como terapéutica contra el

cáncer, ha impulsado a diseñar una quimioterapia vectorizada, en la que los fármacos sean dirigidos a dianas específicas tumorales. Dentro de este contexto, ha surgido el ácido fólico como un ligando interesante para los soportes transportadores de antineoplásicos, ya que las células tumorales muestran una preferencia especial hacia los receptores folato. La especificidad ácido fólico-célula tumoral permite el empleo del ligando como molécula guía de fármacos anticancerígenos hacia las células.

Respecto a la vectorización de los nanogeles con ácido fólico, una de las formas más sencillas de acoplamiento es la unión del ligando a aminas libres mediante el activante EDC, (hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida). Para poder incorporar moléculas guía de ácido fólico mediante este método, es necesario nanogeles base con grupos funcionales amina libre.

Por esta razón, primeramente, se ha incorporado un nuevo monómero a la red polimérica. Este monómero no le conferirá a nuestros materiales ninguna propiedad de hinchamiento (ya que no es un monómero ionizable) y tampoco cambiará sus propiedades de sensibilidad frente a la temperatura. Simplemente nos permitirá la incorporación de los grupos funcionales amina libres para la incorporación del ligando ácido fólico.

Este nuevo monómero es el 2-acril amidoetil carbamato (2AAECM), el cual ha sido sintetizado por el Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Guerrero-Ramírez, Tesis Doctoral, 2009). Este monómero nos permite la incorporación del ligando ácido fólico mediante una reacción de aminólisis. La estructura molecular del 2AAECM se muestra en la figura 4.53.

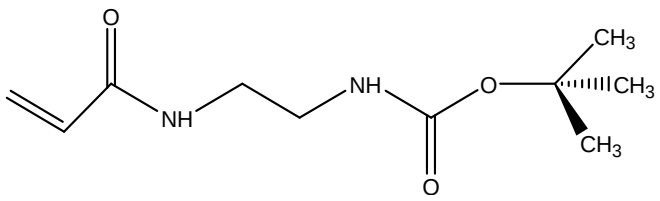


Figura 4.53. Estructura Química del monómero 2-Acril amidoetil carbamato (2AAECM).

4.8.1. Incorporación del monómero 2AAECM a los nanogeles de NIPA-co-DEA.

La síntesis de los nanogeles con la incorporación del monómero 2AAECM se llevó a cabo tanto por polimerización en microemulsión, como en polimerización en nanoprecipitación. Siguiendo los procedimientos de síntesis descritos en la sección experimental, sin alterar las condiciones de reacción para ninguno de los dos métodos.

Por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), pudimos comprobar la incorporación del nuevo monómero a la cadena polimérica de los nanohidrogeles, como se muestra en la figura 4.54. En esta figura puede observarse la incorporación del nuevo monómero a partir de la señal del grupo terbutoxi (triplete), apareciendo a 1,3 ppm.

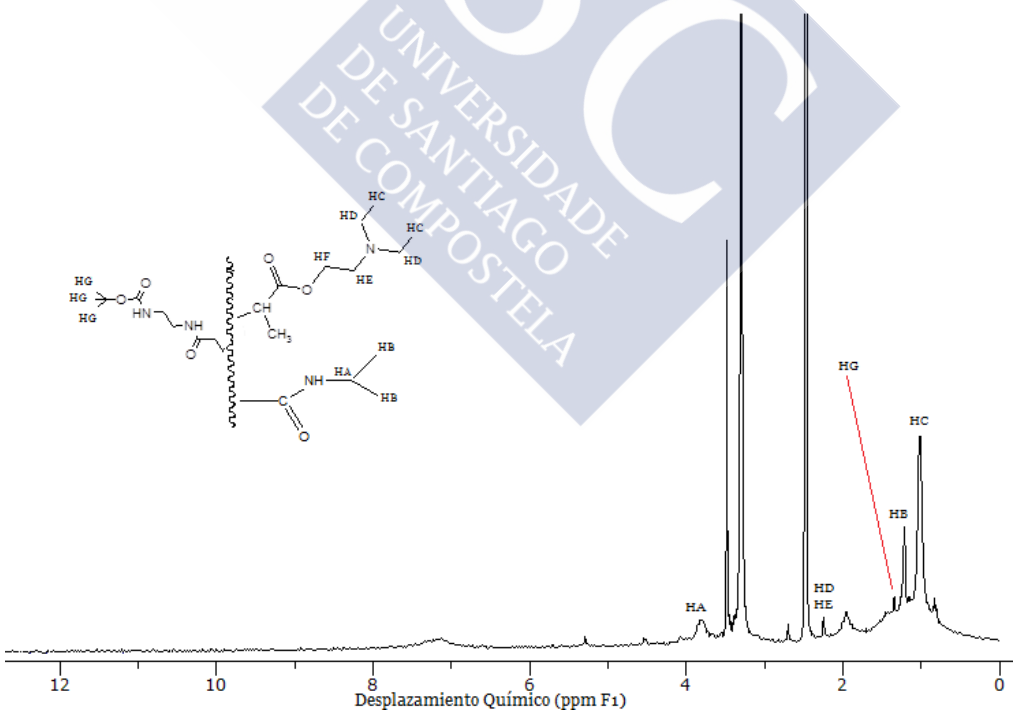


Figura 4.54. Espectro RMN de protón de la muestra M11 sintetizado con el monómero 2AAECM.

4.8.2. Reacción de aminólisis para la obtención del conjugado folato.

Para la introducción de una molécula "alargadora" que nos permitiera anclar por medio de una reacción química el ácido fólico, se utilizó una molécula monoprotegida (etiléndiamina monoprotegida) obtenida mediante un tratamiento previo sintético (Guerrero-Ramírez, Tesis Doctoral (2009)).

Para esto, se empleó una reacción de aminólisis, empleando como reactivo nucleófilo, la amina monoprotegida, N-ter-butoxicarbonil-etiléndiamina (NHBOC); lo que permitió la sustitución del grupo terbutoxi del monómero 2AAECM por el grupo NHBOC tal como se muestra en la figura 4.55.

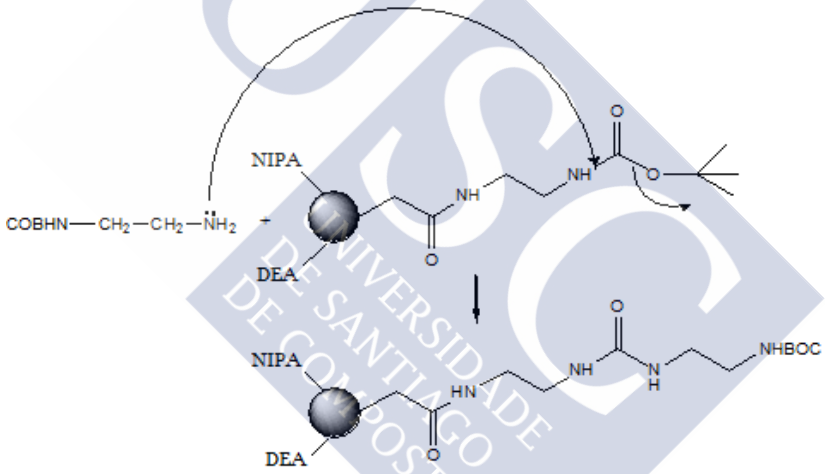


Figura 4.55. Reacción de aminólisis de los nanogeles de NIPA-DEA-2AAECM con NHBOC.

Después de la incorporación del NHBOC en la matriz polimérica, el siguiente paso consistió en reactivar el grupo amina previamente protegido para acoplarlo al nanogel. Este procedimiento implicó la desprotección del grupo amia, para poder éste ejercer su funcionalidad básica. Las condiciones típicas de desprotección sugieren que este procedimiento puede llevarse a cabo adicionando un medio ácido, tal y como se muestra en la figura 4.56.

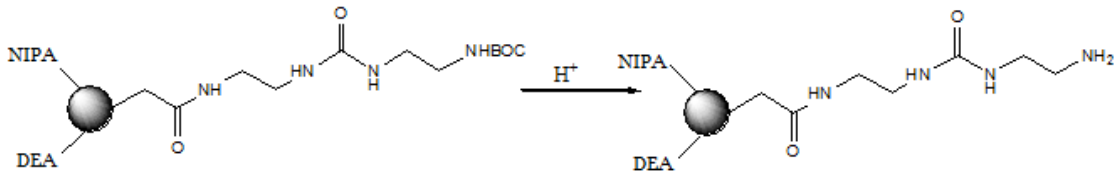


Figura 4.55. Reacción de desprotección del grupo amino monoprotegido en el nanogel.

4.8.3. Vectorización con el ligando ácido fólico.

La funcionalización con ácido fólico se realiza mediante el uso de un agente activante del ácido fólico, el EDC, que al ser una carbodiimida hidrosoluble puede ser utilizada en agua y cuya urea correspondiente es soluble en disolventes polares. La figura 4.56 muestra un esquema general de la inclusión de ácido fólico en la matriz polimérica.

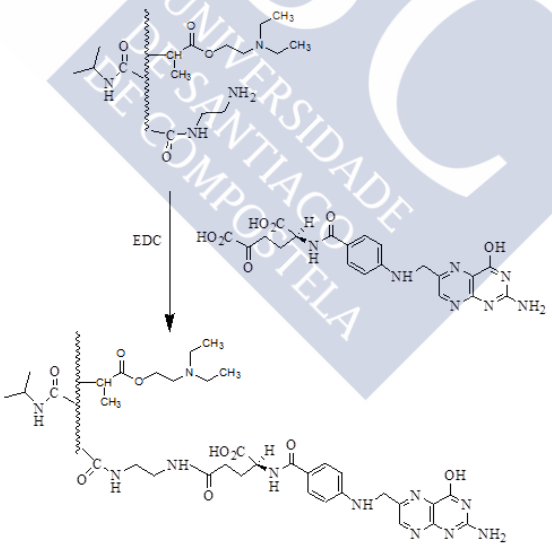


Figura 4.56. Esquema de la funcionalización con ácido fólico de los nanogeles de NIPA-DEA-2AAECM.

Así mismo, mediante RMN H^1 se pudo observar, cualitativamente la introducción de la funcionalidad folato en los nanogeles, como puede observarse en

la figura 4.57.

Ácido fólico RMN H1(D2O/CD3COOD): δ = 8,64 ppm (s, PtC7H, 1H), 7,66-7,63 (d, Ph-C2H y Ph-C6H, 2H, J = 8,4 Hz), y 6,64-6,61 (d, Ph-C3H y Ph-C5H, 2H, J = 8,4 Hz).

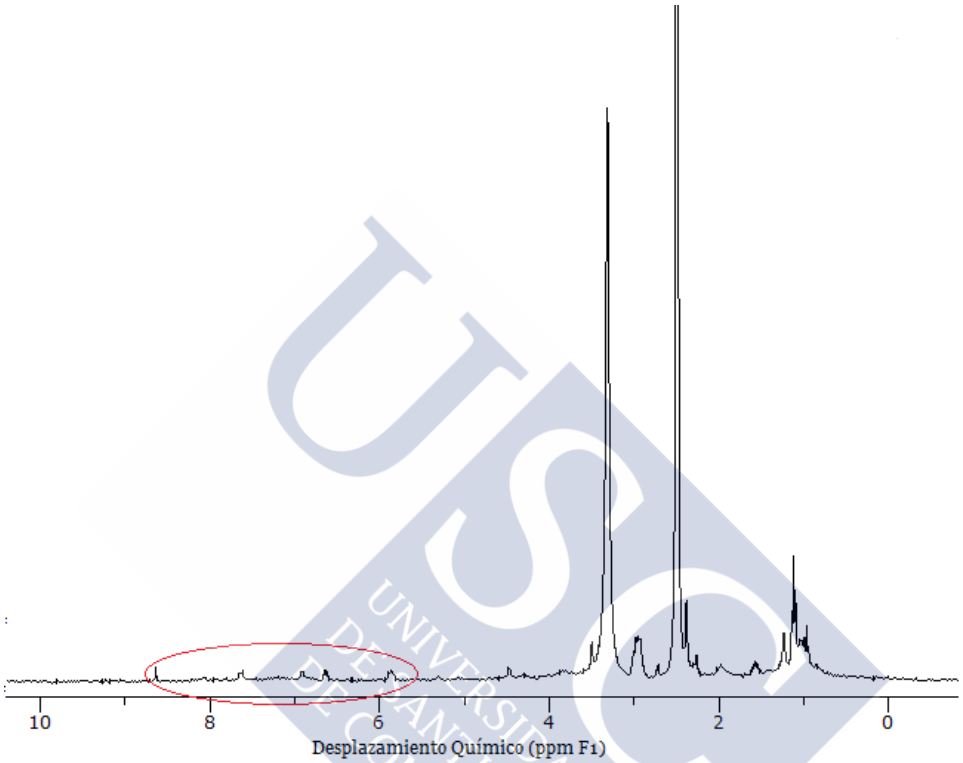


Figura 4.57. Espectro RMN H1 de nanogeles (muestra M11) modificados con ácido fólico.

Hay que mencionar que aunque las señales correspondientes al ácido fólico tienen poca resolución se han empleado por otros autores (*Billmeyer,* 1955), como indicador de la conjugación exitosa entre el ácido fólico y las cadenas de polímero (*York et al., 2009*).

4.9. Pruebas biológicas.

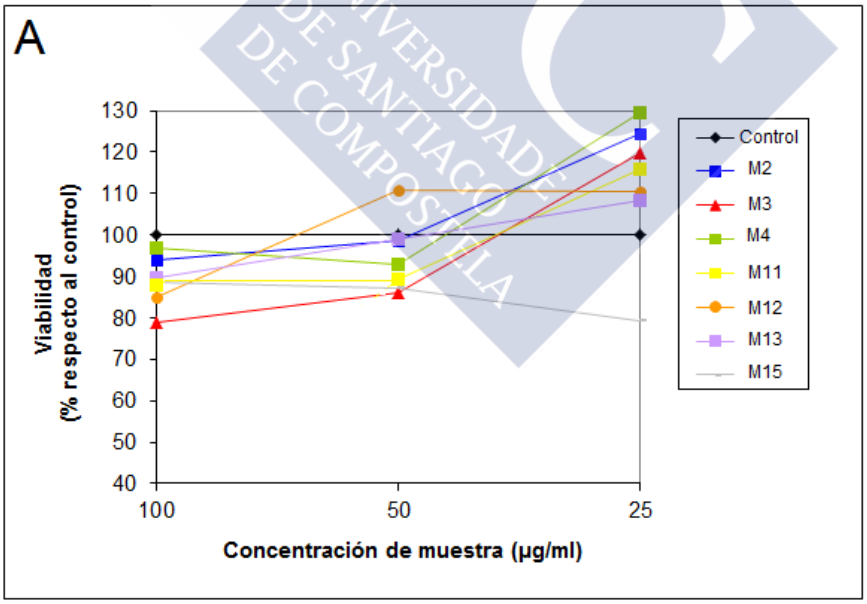
Finalmente, se realizó una serie de pruebas biológicas utilizando los

nanogeles sintetizados en este proyecto para evaluar su posible utilización en la destrucción de células cancerígenas. Estas pruebas se realizaron con la colaboración del departamento de Biología celular e Histología de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) de Vizcaya.

4.9.1. Viabilidad celular con nanogeles sin fármacos.

Primeramente, se realizaron pruebas de viabilidad celular (células melanoma murino B16F10) con los nanogeles sin contener ningún fármaco en su estructura y sin funcionalizar con ácido fólico. Con estas pruebas podríamos comprobar que los nanogeles no son tóxicos por sí solos.

La figura 4.58 muestra los resultados para las muestras sintetizadas por microemulsión como para las muestras sintetizadas por nanoprecipitación, en la cual puede observarse que ninguna de las muestras tiene un considerable efecto de reducción de la población celular.



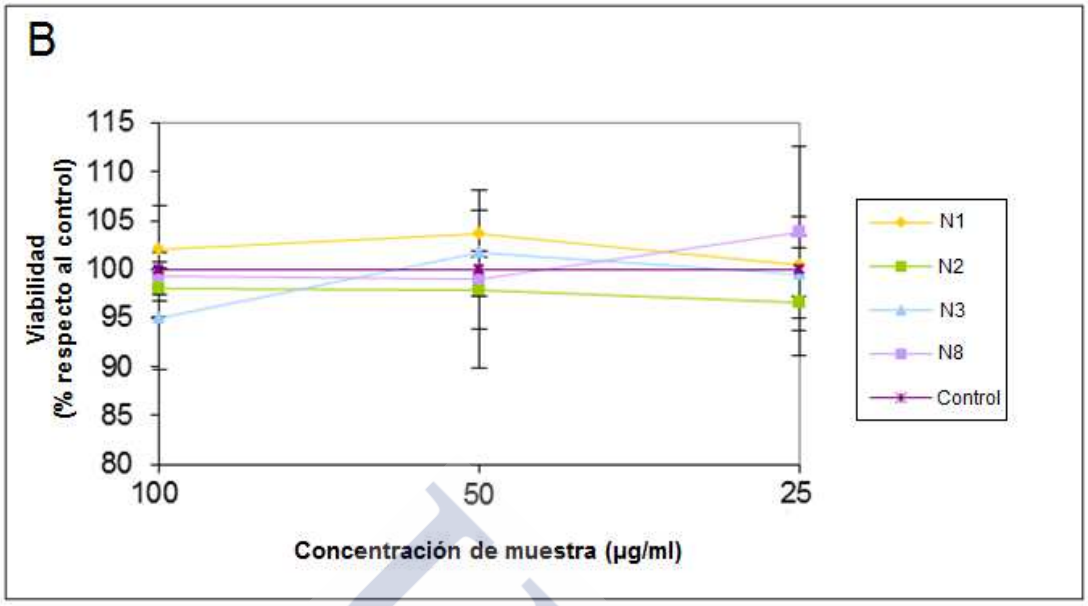


Figura 4.58. Viabilidad celular sin fármaco (A) muestras sintetizadas por microemulsión y (B) muestras sintetizadas por nanoprecipitación.

Puede observarse en la misma figura que las muestras sintetizadas por nanoprecipitación (B), presentan una disminución menor en la población celular (95%) en comparación con las muestras sintetizadas por microemulsión (A), las cuales pueden reducir la población a un 80% respecto al control. Este efecto podríamos atribuirlo a algún probable residuo de agentes tensioactivos, ya que aunque se eliminan con varios lavados, la remoción completa de ellos es complicada.

4.9.2. Internalización de los nanogeles en células tumorales.

La internalización de las nanopartículas a las células tumorales (células melanoma murino B16F10) se siguió a través de la técnica de microscopía confocal. Para esto, las nanopartículas estuvieron en contacto con una solución de un compuesto fluorescente (Cumarina-6), y poder observarlas en el microscopio.

Se siguió la internalización para muestras con ácido fólico y sin ácido fólico. En la figura 4.59 se muestra la imagen del proceso de internalización para la

muestra M11 conteniendo ácido fólico (respecto al tiempo), en la cual se observa que las nanopartículas se adentran en el núcleo celular con éxito. Sin embargo, las muestras que no contenían ácido fólico, también presentaron internalización en las células, por un proceso denominado endocitosis inespecífica; sin embargo, el tiempo que tardan en adentrarse es largo en comparación con las que tienen ácido fólico. El tiempo de internalización de las muestras que contenían ácido fólico fue de aproximadamente 20 min., las muestras que no contienen ácido fólico, tardaron alrededor de 1 hora y 30 minutos pero sin adentrarse el 100% de ellas.

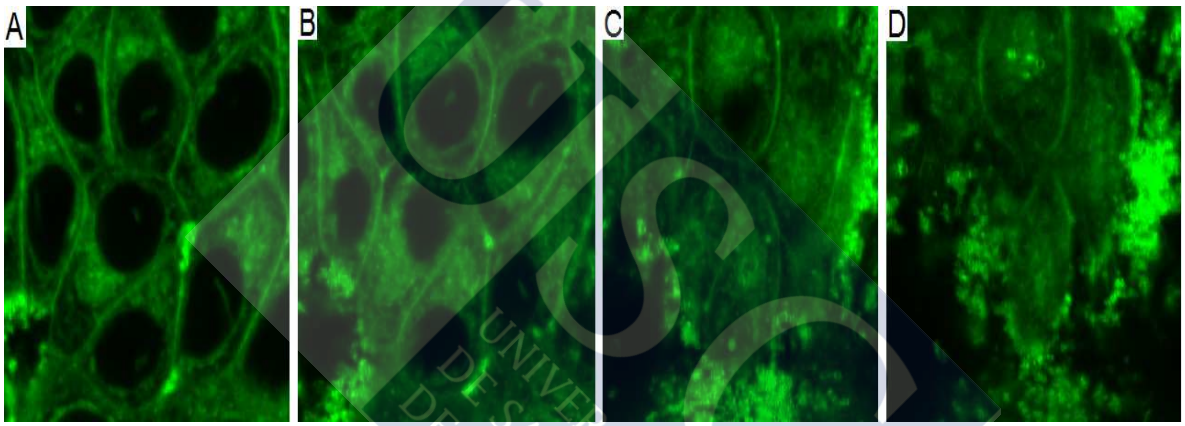


Figura 4.59. Internalización de las nanopartículas en células tumorales (melanoma murino B16F10). (A) 2 min. (B) 5 min. (C) 10 min. y (D) 20 min.

4.9.3. Viabilidad celular con nanogeles conteniendo 5-Fu.

Se realizó la viabilidad celular con nanopartículas conteniendo el fármaco antineoplásico 5-Fu para evaluar su efectividad causando apoptosis en 4 diferentes tipos de tejidos de líneas celulares cancerígenas (melanoma (MEL HO), cáncer de pecho MCF-7), neuroblastoma (SMS-KCNR) y cáncer de colon (HCT-8)).

Esta prueba se realizó para la muestra M11 sintetizada por polimerización en microemulsión, mostrando resultados positivos en la destrucción de las células cancerígenas.

En la figura 4,60 se muestran los resultados obtenidos, en donde se aprecia una clara disminución en la población celular al ser tratadas con las nanopartículas con 5-Fu. La línea celular para la cual se observaron los mejores resultados fue para las células MEL OH.

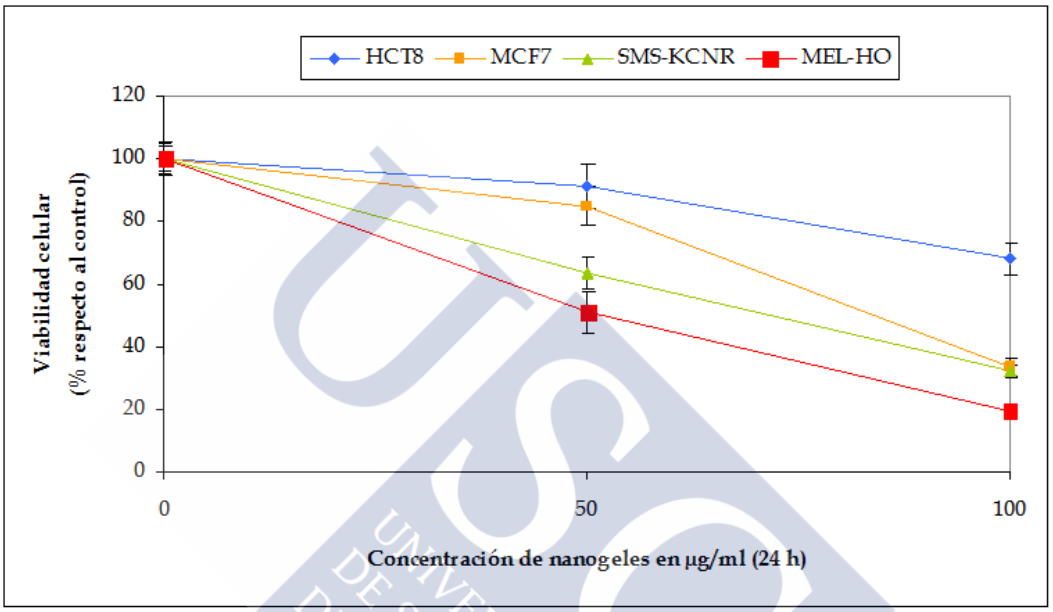


Figura 4.60. Viabilidad celular en 4 diferentes tipos de tejidos con carcinomas, utilizando nanopartículas conteniendo el fármaco 5-Fu.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El objetivo de esta memoria ha sido sintetizar y caracterizar nanopartículas copoliméricas que sean capaces de responder a estímulos externos de pH y de temperatura, utilizando para la síntesis dos métodos distintos: la polimerización en microemulsión y la polimerización en nanoprecipitación, a partir de los monómeros NIPA y DEA. Estos materiales han sido diseñados para ser utilizados como transportadores de fármacos que tengan la capacidad de causar apoptosis en las células cancerígenas, por lo que se han estudiado las propiedades de encapsulación y de liberación para tres fármacos distintos, el 5–fluoracilo, la metformina y la terfenadina, por medio de la técnica de ultravioleta visible. Para lograr que estos materiales sean capaces de atravesar las membranas celulares a través de endocitosis medida por un receptor (EMR), se ha utilizado una estrategia para su funcionalización con el ligando ácido fólico. Por último, se ha probado su eficiencia "*in vitro*" en diferentes células cancerígenas.

A la vista de los resultados experimentales obtenidos en la presente memoria se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Las técnicas de microemulsión inversa y de nanoprecipitación, resultaron ser métodos adecuados para la obtención de nanogeles de NIPA–co–DEA de tamaño coloidal.

2. La polimerización en microemulsión inversa nos permitió la obtención de nanopartículas en un intervalo de diámetros hidrodinámicos entre ≈ 70 y 140 nm. Por su parte, los diámetros hidrodinámicos obtenidos por el método de polimerización en nanoprecipitación se encuentran en el intervalo de ≈ 20 a 60 nm.

3. Los nanogeles sintetizados a partir de ambos métodos de polimerización, presentan sensibilidad al pH del medio, aumentando su hinchamiento en medio ácido. Este comportamiento puede ser regulable, dependiendo de la concentración de grupos ionizables en la red polimérica.

4. La sensibilidad de los nanogeles resultó no deberse al 100 % por la incorporación del monómero NIPA en la cadena polimérica, sino que el monómero DEA también influyó en este comportamiento, desplazando ligeramente el pH de hinchamiento hacia valores más ácidos.

5. La capacidad de las nanopartículas para la encapsulación de los fármacos seleccionados depende de la capacidad de hinchamiento de la muestra, la cual a su vez depende del porcentaje de entrecruzamiento. Esto es, a mayor hinchamiento (menor grado de agente de entrecruzante), mayor retención de fármaco en la estructura polimérica.

6. La liberación de los fármacos a través de las nanopartículas se puede considerar eficiente. A pH de 5,4, la liberación del fármaco encapsulado fue mayor que a pH de 7,4. Dicha liberación también presenta dependencia de la capacidad de hinchamiento de la muestra y por lo tanto al grado de entrecruzamiento de la muestra. Estos resultados demuestran el potencial de los nanogeles para su uso como transportadores de principios activos.

7. Cuando dos fármacos se encapsularon en el mismo medio de transporte, se observó una disminución en la concentración de fármaco retenida en la red polimérica en comparación de su homo–encapsulación.

8. La liberación de 2 fármacos a través del mismo medio de transporte se vio favorecida para el fármaco que presenta una mayor solubilidad en agua.

9. Las pruebas de viabilidad celular de nuestras nanopartículas (con y sin fármaco retenido en la estructura polimérica) nos permitieron corroborar la posible utilización de estos materiales como

transportadores de fármacos antineoplásicos. Primeramente, dichos nanogeles resultaron no ser tóxicos para las células cuando no contienen ningún medicamento encapsulado. Mientras tanto, se comprobó la eficiencia de nuestros nanogeles en la eliminación de células cancerígenas de diversos tipos, reduciendo su población hasta en un ≈ 80% de la población inicial.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A

Akelah A; Moet A. (eds), Functionalized Polymers and Their Applications, ed. Chapman and Hall, Londres **(1990).**

Allemann E; Gurny R; Doelker E. *Int J PhARM* **1992**; 87:247-53.

Allemann E; Gurny R; Doelker E. *Eur J Pharm Biopharm* **1993**; 39:173-91.

Amalvy JI; Wanless EJ; Li Y; Michailidou V; Armes S.P. *Langmuir* **2004**; 20:8992-8999.

Andrade JD. Hydrogels for Medical and Related Applications. *ACS Symp. Ser., 31, Am. Chem. Soc.* **(1976).**

Anthony A.C. *Blood*, **1992**; 79:2807-2820.

Anton N; Benoit JP; Saulnier P. *J Control Release* **2008**; 128:185-99.

B

Bamford CH; Ledwith A; Sen Gupta PK. *J. Appl. Polym. Sci.* **1980**; 25: 2259.

Bell CL; Peppas, NA. *Adv. Polym. Sci.* **1995**; 122:125-175.

Biesenberger JA. Principles of Polymerization Engineering. Willey and Sons, New York, **(1983)**.

Billmeyer FW Jr; Than CB. *J Amer Chem Soc.* **1955**; 77:4763-4767.

Bindschaedler C; Gurny R; Doelker E. Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof. US patent 4,968,350 **(1990)**.

Blanco MD; Olmo RM; Teijón JM. Enciclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 1, Hydrogels (pp. 2021-2039), E.U.A., Editor: James Swarbrick. 3ª Ed, **(2007)**.

Blanco MD; Guerrero S; Teijón C; Olmo R; Guerrero G; Teijón JM; Katime I. *Methods and Findings in experimental and clinical Pharmacology* **2008**; 30:121.

Blanco MD; Guerrero S; Benito M; Fernández A; Teijón C; Olmo R; Katime I; Teijón JM. *Polymers* **2011**; 3(3):1107-1125.

Brahim S; Narinesingh D; Elie GA. *Anal Chim Acta* **2001**; 448:27-36.

Bunyakana C; Hunkelerb D. *Polymer* **1999**; 40(23):6213–6224.

Byrne JD; Betancourt T; Brannon-Peppas. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008;** 60:1615-1626.

C

Cai C; Zhou K; Wu Y; Wu L. *J Drug Target* **2006**; 14:55-61.

Calvo P; Remunan-López; Vila-Jato JL; Alonso M. *J. Pharm. Res* **1997;** 10: 1431-1436.

Cao S; Rustum YM. *Cancer Res* **2000;** 60:3717-3721.

Carothers WH. *Chem. Rev* **1931**; 8:402.

Castro E; Mosquera V; Katime I. *Nanomaterials & Nanotechnology* **2012**; 2:1-9.

Chen SJ; Du F-S; Wu Z-Q; Huang L; Li Z-C; Li F-M. *Polym Preprint* **1997;** 38:534.

Cho SH; Jhon MS; Yuk SH; Lee HB. *J Poly Sci B Polym Phys* **1997**; 35:595.

Chow P; Gan L. *AdvPolym Sci* **2005**; 175:257–298.

Cohn D; Aronhime M; Abdo B. *Pure Appl. Chem*. A **1992**; 29:841.

Corkhill PH; Jolly AM; Ng CO; Tighe BJ. *Polymer* **1987**; 28:1758-1766.

Cornejo–Bravo JM; Siegel RA. *Biomaterials* **1996**; 17:1187-1193.

Couvreur P. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*. **1998**; 5:1-20.

Couvreur P; Brigger I; Dubernet C. *Adv Drug Delivery. Rev*. **2002;** 54:631-651.

Crespy D; Stark M; Hoffmann-Richter C; Ziener U; Landfester K. *Macromolecules* **2007**; 40:3122-35.

D

Danicher L; Frere Y; Calve AL. *Macromol Symp* **2000**; 151:387-92.

De Jaeghere F; Allemann E; Leroux JC; Stevels W; Feijen J; Doelker E; Gurny R. *Pharm Res* **1999**; 16:859-66.

Dincer S; Turk M; Piskin E. *GeneTher* 12 **2005;** 12:S139-S145.

Downey JS; Frank RS; McIsaac G; Stöver HDH. *Polymer Preprints (Amer. Chem. Soc., Polym. Chem.)*. **1999**; 4012:950.

Duncan R. *Nat. Rev. Drug Discov* **2003;** 2:347-360.

Duncan R. *Nat. Rev. Cancer* **2006;** 6:688-701.

E

El-Mir MY; Nogueira V; Fontaine E; Averet N; Rigoulet M; Leverve X. *J. Biol. Chem*. **2000**; 275:223–228.

Emileh A; Vasheghani-Farahani; Imani M. *European Polymer Journal* **2007**; 43 (5):1986-1995.

Errico C; Bartoli C; Chiellini F; Chiellini E. *J Biomed Biotechnol* **2009**; 20:821-31.

European Commission. Boletín de Salud Pública (Enfermedades crónicas y de alta prevalencia). Sitio web oficial ec.europa.eu/ **(2013).**

F

Faheem AS; Nasser AMB; Muzafar AK; Santosh A; Myung SK; Kim HK. *J Mater Sci Mater Med* **2009**; 20:821-31.

Fessi H; Puisieux F; Devissaguet JP; Ammoury N; Benita S. *Int J Pharm* **1989**; 55:R1-4.

Frank RS; Downey JS; Stöver HDH. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem* **1998**; 36:2223.

Franklin VJ; Bright AM; Tighe BJ. *Trends in Polymer Science* **1993;** 1:9.

Flory P.J. *Principles of Polymer Chemistry*, **1953**, Cornell University Press, Ithaca, New York.

G

Galindo-Rodriguez SA; Puel F; Briancon S; Allemann E; Doelker E; Fessi H. *Eur Pharm Sci* **2005**; 25:357-367.

Gan LH; Roshan Deen G; Loh XJ; Gan YY. *Polymer* **2001**; 42:65.

Ganachaud F; Katz JL. *Chem Phys Chem* **2005**; 6:209-16.

Gaudin F; Zydowicz NS. *Colloid Surf A* **2008**; 331:133-42.

Geckeler KE; Stirn J. *Naturwissenschaften* **1993**; 80:487-500.

Gilbert R.G. Emulsion Polymerization. Ed. Academic Press, **(1995)**.

Grammaticos PC; Diamantis A. *Hell J Nucl Med*. **2008**; 11(1):2-4.

Gonzalez N; Elvira C; Roman JS. *Macromolecules* **2005**; 38:9298.

Guerrero-Ramírez L.G; Nuño-Don Lucas S.M; Cesteros L.C; Katime I. *Materials Chemistry and Physics* ***2008****; 112(3):1088-1092.*

Guerrero-Ramírez L.G. Síntesis de nanogeles copoliméricos inteligentes para su utilización en la liberación controlada y selectiva de fármacos. *Tesis Doctoral* **2009;** Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

H

Harkins WD. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**; 69(6):428-44.

Hickey SA; Peppas N.A. *J. Membr. Sci.* 107 **1995;** 107:229-237.

Hiemenz P.L. Principles of Colloids and Surface Chemistry. Marcell of Kerr Inc. **(1977).**

Hjartåker A; Weiderpass E; Bray F.I. *International Encyclopedia of Public Health* **2008**; 452-464.

Horta Zubiaga A. *Macromoléculas*. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Impresos y Revistas, S.A. (IMPRESA), Madrid. **(1994)**.

Hühn D; Kantner K; Geidel C; Brandholt S; De Cock I; Soenen S.J.H; Rivera-Gil P; Montenegro J.M; Braeckmans K; Müllen K; Nienhaus G.U; Klapper M; Parak W.J. *ACS Nano* **2013**; 7(4):3253–3263.

I

ICD-O-3. International Classification of Diseases for Oncology 3th Edition. Clasificacion de la World Health Organization, **2013**.

Instituto Nacional de Estadística, *sitio web oficial. http://www.ine.es*. España, **2013.**

J

Jangi SM; Asumendi A; Arlucea J. *Oncol Res* **2004**; 14:363-372.

Jangi SM; Díaz-Pérez JL; Ochoa-Lizarralde B; Martín-Ruiz I; Asumendi A.; Pérez-Yarza G. *Carcinogenesis* **2006**; 27:1787-1796.

Jangi SM; Ruiz-Larrera MB; Nicolau-Galmés F; Andollo N; Arrollo-Berdugo Y; Ortega Martínez I. *Carcinogenesis* **2008**; 29:500-509.

Juba M.R. *ACS Symposium Series*, **1979**, 104 (Polym. React. Processes) 267.

Jung J; Perrut M. *J Supercrit Fluids* **2001**; 20:179-219.

Jung SW; Jeong YI; Kim YH; Kim SH. *Arch Pharm Res* **2004**; 27:562-9.

Jung T; Kamm W; Breitenbach A; Kaiserling E; Xiao JX; Kissel T. *Eur J Pharm Biopharm* **2000**; 50:147.

K

Kroemer J. *Cancer's Achilles' heelCancer Cell*, **2008**; 13:472–482.

Karlsson JO; Gatenholm P. *Macromelecules* **1999;** 32:7594-7598.

Karode SK; Kulkarni SS; Suresh AK; Mashelkar RA. *Chem Eng Sci* **1998**; 53:2649-63.

Katime I; Katime O; Katime D. Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares, síntesis, propiedades y aplicaciones. País Vasco, Editor: Universidad del País Vasco **(2003)**.

Kawashima Y. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**; 47:1-2.

Kim TH; Jiang HL; Nah JW; Cho MH; Akaike T; Cho CS. *Biomed. Mater* **2007;** 2:95-100.

Korsmeyer RW; Peppas N. A. *Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems*. In: Roseman TJ, Mandsdorf SZ (Eds.). Controlled release delivery systems. New York, USA: Marcel Dekker Inc, **(1991).**

Kreuter J. Nanoparticles. In: Kreuter J, editor. Colloidal drug delivery systems, vol. 66. New York: Marcel Dekker; **(1994)**, p. 219-342.

Kroemer G; Pouyssegur J. *Cancer's Achilles' heel Cancer Cell*. 13 **2008**; 13:472–482.

Kubota T. *Jpn J Cancer Chemother* **1999;** 26:1536-1541.

L

Landfester K; Musyanovych A; Mailander V. *J Polym Sci Part A Polym Chem* **2010**; 48:493-515.

Langer R. *Nature* **1998;** 392:5-10.

Langer R; Peppas N.A. *AIChE J* **2003;** 49:2990-3006.

Lastres García JL. Nuevos sistemas orales de liberación modificada. *Schironia* 2002; 1:63-71.

Leamon CP; Low PS. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2001;** 88:5572-5576.

Leamon CP; Low PS. *J. Biol. Chem*. **1992;** 267:24966-24971.

Leamon CP; Low PS. *Biochem. J* **1993;** 291:855-860.

Leamon CP; Pastan I; Low PS. *J. Biol. Chem* 268 **1993;** 268:24847-24854.

Lee PI. *J. Controlled Release* **1985;** 2:277.

Lee RJ; Wang S; Low PS. *Biochim. Bioph. Acta* **1996;** 1312:237-242.

Li K; Stöver HDH. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem* **1993,** 31, 3257.

Liu JD; Wang YJ; Chen CH; Yu CF; Chen LC; Lin JK. *Mol Carcinog* **2003**; 37:39-50.

Liu M; Zhou Z; Wang X; Xu J; Yang K; Cui Q; Chen X; Cao M; Weng J; Zhang Q. *Polymer* **2007**; 48:5767-79.

Longley DB; Harkin DP; Johnston PG. *Nat Rev Cancer* **2003;** 3:330-338.

Lu Y; Low PS. *Adv Drug Deliver. Rev* **2002;** 54:675-693.

M

Maeda S; Yoshida H; Ogura K; Mitsuno Y; Hirata Y; Yamaji Y; Akanuma M; Shiratori Y; Omata M. *Gastroenterology* **2000;** 119(1):97-108.

Mao X; Liang SB; Hurren R; Gronda M; Chow S; Xu GW. *Blood* **2008**; 112:760-769.

Matyjaszewski K; Xia J. *Chem Rev* **2001**; 101:2921-90.

Mishima K. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**; 60:411-32.

Moreno MD. Toxicología ambiental, evaluación de riesgo para la salud humana. Primera edición. McGraw-Hill. Madrid, España. **(2003).**

Mu L; Feng SS. *J Controlled Release* **2003;** 86:33-48.

N

Na K; Lee KH; Bae YH. *J Control Release* **2004**; 97:513.

National Institute of Cancer. *Sitio web oficial http://www.cancer.gov*. Estados Unidos de América, **2013**.

Nguyen CA; Allemann E; Schwach G; Doelker E; Gurny R. *Eur J Pharm Sci* **2003**; 20:217-22.

Nie L; Jiang W; Yang W; Wang C; Fu S. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **2005**; 42(5): 623.

O

Odian G. Principles of polymerization, Third edition, J. Wiley, New York, **(1991).**

Oyewumi MO; Yokel RA; Michael Jay M; Coakley T; Mumper RJ. *J. Control. Release* **2004;** 95:613-626.

P

Parker WB; Cheng YC. *Pharmacol Ther* **1990;** 48:381-395.

Parsons ME; Ganellin CR. *Br J Pharmacol* **2006** 147(1):S127-S135.

Pedley G, Skelly PJ; Tighe BJ. *Br. Polym. J;* R:99 **(1980)**.

Peppas N.A; Mikos A.G. Preparation methods and structure of hydrogels, en: N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy* Vol.1, CRC Press,Boca Raton, FL, **(1986)** 1-27.

Peppas N.A. *J Bioact. Compat. Polym* **1991;** 6:241-246.

Peppas N.A; Bures P; Leobandung W; Ichijawa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000;** 50:27-46.

Peppas N. A. *Adv Drug Deliv Rev* **2004;** 56:1529-1531.

Pérez L; Sáez V; Hernáez E; Katime I. *Macromolecular Chemistry & Physics* **2009**; 210 (13-14):507.

Poersch HG; Avela A; Reichert KH. *Die Ang. Makromol. Chem* **1993**; 206:157.

Poon Z; Lee JA; Huang S; Prevost RJ; Hammond PT. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2011;** 7:201-209.

Prasad Rao J; Geckeler K.E. *Progress in Polymer Science* **2011;** 36:887-913.

R

Raemdock K; Demeester J; De Smedt S. *Soft Mater* **2009**; 5:707.

Ratner BD. Hoffman A.S. *American Chemical Society, Washington,* pp. 1 **(1976).**

Reddy J.A; Low P. S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst* **1998;** 15(6):587-627.

Reverchon E. *J Supercritic Fluids* **1999**; 15:1-21.

Rodríguez F. Principios de sistemas de polímeros. Ed. El Manual moderno S.A de C.V. México D.F **(1984).**

Romack TJ; Maury EE; DeSimone JM. *Macromolecules* **1995**, 28, 912.

S

Sampathkumar S.G; Yarema K.J. *Chem. Biol* **2005;** 12:5-6.

Schmalz A; Hanisch M; Schmalz H; Muller Axel HE. *Polymer* **2010**; 51: 1213–1217.

Schmid G. Nanoparticles: from theory to applications. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Publishers;* **2004**.

Schott H. *J Pharm Science*, **1992**; 81:467.

Scott TF; Schneider AD; Cook WD; Bowman CN. *Science* **2005**; 308(5728):1615-7.

Shariati A; Petters CJ. *Curr Opin Solid Satate Mater Sci* **2003**; 7:371-83.

Shen Z; Li Y; Kohama K; Oneill B; Bi J. *Pharmacol Res* **2011;** 63(1):51-58.

Shibayama M; Suetoh Y; Nomura S. *Macromolecules* **1996;** 29:6966.

Simons FE. *N Engl J Med* **2004**; 351:2203-2217.

Sudimack J; Lee R.J. *Adv. Drug Deliver. Rev* **2000;** 41:147-162.

T

Tighe B.J. *Br Polym J* **1986**; 18:8.

Tobolsky A.V; Shen M.C. *J. Phys. Chem* **1963**; 67:1886.

Torini L; Argillier JF; Zydowicz N. *Macromolecules* **2005**; 38:3225-36.

V

Vanderhoff JW; El Aasser MS; Ugelstad J. Polymer emulsification process. US patent 4,177,177 **(1979)**.

Vauthier C; Couvreur P. Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems. In: Wise DL, editor. Handbook of pharmaceutical controlled release technology. New York: Marcel Dekker; **2000**, p. 13-429.

Vemavarapu C; Mollan MJ; Lodaya M; Needham TE. *Int J Pharm* **2005;** 292:1-16.

Vitale SA; Katz J.L. *Langmuir* **2003**; 19:4105-4110.

W

Wang S; Luo J; Lantrip DA; Waters DJ; Mathias CJ; Green MA; Fuchs PL; Low PS. *Bioconjug. Chem* **1997;** 8(5):673-679.

Wang X; Summers CJ; Wang ZL. *Nano Lett* **2004;** 4:423-6.

Welz M; Ofner CM. *Pharm Science* **1992;** 81:85-90.

Wichterle O. Lím D. *Nature* **1960**; 185: 117-118.

Wichterle O. *Encyclop. Polym. Sci and Technol*; 1ª Ed., 15 **(1971)** 273.

Wood J.M; Attwood D; Collett J.H. *J Pharm Pharmacol* **1982;** 34(1):1-4.

World Health Organization, *sitio web oficial. http://www.who.int*, **(2013)**.

Wu M; Dellacheriea E; Durand A; Marie E. *Colloid Surf B* **2009**; 69:147-51.

Y

York A.W; Zhang Y; Holley A.C; Guo Y; Huang F; Charles L. McCormick C.L. **(2009)**. *Biomacromol* **2009;** 10:936-943.

York P. *Pharm Sci Technol Today* **1999**; 2:430-40.

Z

Zhang H; Mardyani S; Chan WCW; Kumacheva E. *Biomacromolecules* **2006**; 7:1568.

Zhang Q; Chuang KT. *Adv Environ Res* **2001**; 5:251-8.

Zhang W; Tao M; Hu Z; Zhang Z. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2007;** 305:58-65.

Zhao X.T; Cao Q; Zheng L.Q; Zhang G.Y. Colloids Surf A. **2006**, 281(1-3):67-73.

Zetterlund PB; Nakamura T; Okubo M. Macromolecules **2007**; 40:8663-72.

Zetterlund PB; Kagawa Y; Okubo M. *Chem Rev* **2008**; 108:3747-3794.

Zweers MLT; Engbers GHM; Grijpma DW; Feijen J. *J Control Release* **2004**; 100:347-56.