



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA VECTORIZADO, PH Y
TERMO SENSIBLE COMO POSIBLE TRATAMIENTO PARA LA ARTRITIS
REUMATOIDE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. MAYRA MARTÍNEZ PELÁEZ

TUTORA: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

FACULTAD DE QUÍMICA

CDMX, SEPTIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	Dr. David Quintanar Guerrero
Vocal	Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook
Vocal	Dra. Luz María Melgoza Contreras
Vocal	Dr. Emilio Bucio Carrillo
Secretario	Dr. José Juan Escobar Chávez

Asesora

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Sitio en el que se efectuó

Laboratorio 100 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de
Química de la UNAM
Laboratorio de Sistemas de Liberación de Fármacos del Departamento de Farmacia de la
Facultad de Química de la UNAM

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química, por acogerme durante varios años y brindarme todas las herramientas para formarme profesionalmente.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por darme la oportunidad de expandir mis conocimientos y poner en práctica mis habilidades durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico que me otorgó, durante mis estudios de maestría; con la beca No. 629325.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por el financiamiento para poder asistir al 22nd International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Formulations, efectuado del 4 al 6 de julio de 2019, en Valencia, España.

A mi asesora, la Dra. María Josefa Bernad Bernad, por su invaluable apoyo, confianza y enseñanzas, que me han servido para la realización de todos mis proyectos.

Al Dr. Jesús Gracia Mora, por compartir sus conocimientos conmigo y brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dr. Verónica Henao Holguín, al Dr. Iván Darío Rojas Montoya y al Dr. Fabio Vengoechea, por compartirme sus experiencias, las cuales me sirvieron para enriquecer mi proyecto.

A la Dra. Blanca Domínguez, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por su ayuda para la obtención de los estudios de resonancia.

Al F. Josué Romero Ibarra, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por su colaboración en los estudios de microscopía electrónica.

Al Dr. Luis Medina Torres, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por proporcionarme el equipo para la realización de los estudios de reología.

Al Q. Juan Manuel Campos Cerón, por brindarme el mejor de los apoyos y siempre mostrar interés en la realización de este trabajo.

A mis sinodales: el Dr. David Quintanar Guerrero, la Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook, la Dra. Luz María Melgoza Contreras, el Dr. Emilio Bucio Carrillo y el Dr. José Juan Escobar Chávez, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis y por sus valiosas contribuciones y consejos para mejorarla.

A todos los integrantes del laboratorio 100 y del laboratorio de Sistemas de Liberación de Fármacos de la Facultad de Química de la UNAM, por sus aportaciones y consejos.

Índice general

Capítulo 1. Introducción.	1
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1 Geles, microgeles y nanogeles	3
2.2 Propiedades de los nanogeles.	3
2.3 Mecanismos de formación de los nanogeles	4
2.4 Métodos de síntesis de los nanogeles	5
2.5 Métodos de purificación de los nanogeles.	6
2.6 Caracterización de los nanogeles.	7
2.6.1 Espectroscopía de Infrarrojo.	7
2.6.2 Dispersión dinámica de la luz	8
2.6.3 Dispersión estática de la luz	8
2.6.4 Microscopías electrónicas	9
2.6.5 Resonancia magnética nuclear	10
2.6.6 Reología	11
2.7 Nanogeles como sistemas de liberación farmacéutica.	13
2.7.1 Nanogeles como sistemas de liberación prolongada.	15
2.7.2 Nanogeles como sistemas de liberación modulada por activación	17
2.7.2.1 Nanogeles sensibles a pH	18
2.7.2.2 Nanogeles sensibles a temperatura	22
2.7.2.3 Caracterización de sensibilidad de estímulos en nanogeles	25
2.7.2.3.1 Turbidimetría	26
2.7.3 Nanogeles como sistemas de liberación vectorizados	27
2.8 Caracterización de nanogeles con fármaco incluido	29
2.8.1 Isotermas de inclusión para nanogeles	30
2.8.2 Potencial zeta en nanogeles recubiertos	32

2.9 Liberación de fármaco de nanogeles	33
2.10 Nanogeles en el tratamiento de la artritis reumatoide.	36
2.10.1 Nanogeles vectorizados para el tratamiento de la artritis reumatoide	37
2.10.2 Nanogeles con MTX para el tratamiento de la artritis reumatoide	37

Capítulo 3. Objetivos

3.1 Objetivo general.	40
3.2 Objetivos particulares.	40

Capítulo 4. Hipótesis 41

Capítulo 5. Metodología experimental

5.1 Materiales	42
5.2 Síntesis de nanogeles.	42
5.2.1 Liofilización de nanogeles.	43
5.3 Caracterización de nanogeles	44
5.3.1 Determinación de la LCST del nanogel mediante turbidimetría	43
5.3.2 Obtención del tamaño de partícula del nanogel a través de DLS	43
5.3.3 Estudio de la estructura química del nanogel mediante espectroscopía FTIR	44
5.3.4 Estudio de la estructura química del nanogel mediante espectroscopía NMR.	44
5.3.5 Obtención del peso molecular aparente del nanogel mediante DLS y SLS	44
5.3.6 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel a través de SEM.	44
5.3.7 Obtención del pK _a del nanogel a través de titulaciones potenciométricas	44
5.3.8 Evaluación de la sensibilidad a pH del nanogel por turbidimetría.	45
5.3.9 Estudios de reología en los nanogeles a diferentes temperaturas	45
5.4 Adsorción de HA en las partículas de nanogel	45
5.4.1 Liofilización de nanogeles recubiertos.	45
5.4.2 Obtención del tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de DLS	46
5.4.3 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de SEM	46

5.4.4 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA mediante la obtención de densidades	46
5.4.5 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA en cada partícula individual de nanogel mediante el peso molecular aparente por DLS y SLS.	47
5.4.6 Determinación de la LCST del nanogel recubierto a diferentes pH mediante turbidimetría	47
5.4.7 Determinación del tamaño del nanogel recubierto a diferentes pH mediante DLS	47
5.4.8 Obtención del pK _a del nanogel recubierto a través de titulaciones potenciométricas.	48
5.5 Adsorción de MTX sódico en partículas de nanogel recubiertas con HA	48
5.5.1 Elaboración de isothermas de adsorción del MTX sódico en el nanogel recubierto con HA.	49
5.5.5 Estudio de la estabilidad del sistema farmacéutico a través de la determinación de potencial zeta con DLS	49
5.6 Estudios de liberación <i>in vitro</i> de nanogeles recubiertos cargados con MTX sódico	49

Capítulo 6. Resultados y discusión

6.1 Síntesis de nanogeles.	51
6.2 Caracterización de nanogeles	55
6.2.1 Determinación de la LCST del nanogel mediante turbidimetría.	55
6.2.2 Obtención del tamaño de partícula del nanogel a través de DLS	60
6.2.3 Estudio de la estructura química del nanogel mediante FTIR	63
6.2.4 Estudio de la estructura química en un nanogel mediante NMR	66
6.2.5 Obtención del peso molecular aparente del nanogel mediante DLS	69
6.2.6 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel a través de SEM	69
6.2.7 Obtención del pK _a del nanogel a través de titulaciones potenciométricas.	71
6.2.8 Evaluación de la sensibilidad del nanogel a pH por turbidimetría.	75
6.2.9 Estudios de reología en los nanogeles a diferentes temperaturas	76
6.3 Adsorción de HA en las partículas de nanogel	79

6.3.1 Obtención del tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de DLS	80
6.3.2 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de SEM	81
6.3.3 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA mediante la obtención de densidades	83
6.3.4 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA en cada partícula individual de nanogel mediante el peso molecular aparente por DLS y SLS.	85
6.3.5 Determinación de la LCST del nanogel recubierto a diferentes pH mediante turbidimetría	86
6.3.6 Determinación del tamaño del nanogel recubierto a diferentes pH mediante DLS	87
6.3.7 Obtención del pK _a del nanogel recubierto a través de titulaciones potenciométricas.	88
6.4 Inclusión de MTX sódico en partículas de nanogel recubiertas con HA	88
6.4.1 Elaboración de isothermas de inclusión del MTX sódico en el nanogel recubierto con HA.	91
6.4.2 Estudio de la estabilidad del sistema farmacéutico a través de la determinación del potencial zeta con DLS	93
6.5 Estudios de liberación <i>in vitro</i> de nanogeles recubiertos cargados con MTX sódico	94
Capítulo 7. Conclusiones.	102
Capítulo 8. Perspectivas	103
Capítulo 9. Referencias.	104
Capítulo 10. Anexos	115

Índice de tablas

Capítulo 2. Antecedentes

Tabla 1	Protonación y desprotonación de poliácidos	19
Tabla 2	Protonación y desprotonación de polibases	21
Tabla 3	Estructuras de polímeros termosensibles con LCST y UCST y sus temperaturas de transición de fase.	24
Tabla 4	Ecuaciones matemáticas de modelos de isotermas de adsorción	31
Tabla 5	Ecuaciones matemáticas y parámetros de los modelos de liberación de fármaco	34
Tabla 6	Mecanismo de liberación y geometría del sistema de acuerdo con n para el modelo <i>Ritger-Korsmeyer-Peppas</i>	35
Tabla 7	Características fisicoquímicas del MTX sódico	38

Capítulo 5. Metodología experimental

Tabla 8	Formulaciones de nanogeles sintetizados	42
----------------	---	----

Capítulo 6. Metodología experimental

Tabla 9	d_H y PDI promedio al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	54
Tabla 10	LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 2% (m/m) de MBA	56
Tabla 11	LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 5 (NV5 5E), 7.5 (NV7.5 5E), 10 (NV10 5E) y 15% (NV15 5E) de 1VI y 5% (m/m) de MBA	57
Tabla 12	LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (m/m)(NV7.5 10E) de MBA.	59
Tabla 13	LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 7.5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (m/m)(NV7.5 10E) de MBA.	59
Tabla 14	d_H y PDI de nanogeles con 7.5% de VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) (m/m) de MBA	60
Tabla 15	d_H y PDI a de nanogel NV7.5 2E para la obtención de su VPPT a pH 5 y 7.	61
Tabla 16	Parámetro V y V_c y S_w del nanogel NV7.5 2E a pH 5 y 7.	62
Tabla 17	Asignación de señales para el espectro de IR del NIPAM	63
Tabla 18	Asignación de señales para el espectro de IR del 1VI	64
Tabla 19	Asignación de señales para el espectro de IR del MBA	65
Tabla 20	Asignación de señales para el espectro de IR del nanogel NV7.5 2E.	65
Tabla 21	Ecuación y parámetros de linealización de la curva de <i>Debye</i> para nanogel NV7.5 2E	69

Tabla 22	Comparación entre G' y G'' a diferentes temperaturas.	78
Tabla 23	Variación del d_H y PDI de nanogeles NV7.5 2E al recubrirlos con distintas cantidades de HA.	81
Tabla 24	Obtención de f a partir de la σ' calculada	83
Tabla 25	Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de la masa de HA y su densidad en una disolución acuosa	84
Tabla 26	Valores obtenidos de la determinación de $\rho_{HA \text{ libre}}$	84
Tabla 27	Ecuación y parámetros de linealización de la curva de <i>Debye</i> para nanogel NV7.5 2E recubierto.	85
Tabla 28	LCST a pH 5 y 7 del nanogel 7.5 2E recubierto.	86
Tabla 29	Comparación entre d_H calculados por DLS de nanogel 7.5 2E sin y con recubrimiento	87
Tabla 30	Comparación ente pK_a de nanogel NV7.5 2E sin y con recubrimiento .	88
Tabla 31	% de entrapamiento de fármaco a las 6 horas en las proporciones nanogel:MTX sódico: 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4	90
Tabla 32	Ajuste al modelo de isoterma de adsorción para nanogel NV7.5 2E recubierto con MTX a las 6 horas	92
Tabla 33	Parámetros del isoterma de adsorción del nanogel NV7.5 2E recubierto con MTX a las 6 horas de acuerdo con modelo de <i>Sips</i>	92
Tabla 34	Potencial zeta de nanogel NV7.5 2E sin recubrir, NV7.5 2E con recubrimiento y NV7.5 2E con recubrimiento y MTX adsorbido	94
Tabla 35	Características de pH y temperatura de condiciones para liberación <i>in vitro</i>	94
Tabla 36	Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación <i>in vitro</i> de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en medio 1: pH=7, T=25°C.	97
Tabla 37	Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación <i>in vitro</i> de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en medio 2: pH=7, T=37°C.	97
Tabla 38	Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación <i>in vitro</i> de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en medio 3: pH=5, T=37°C.	97
Tabla 39	Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación <i>in vitro</i> de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en medio 4: pH=5, T=39.5°C.	97
Tabla 40	Parámetros de ajuste a modelo <i>Peppas-Sahlin</i> para la liberación del 60% de MTX en nanogel NV7.5 2E recubierto para los medios 3 y 4	99
Tabla 41	Parámetros cinéticos del modelo <i>Peppas-Sahlin</i> para la liberación de MTX en nanogel NV7.5 2E recubierto para los medios 1, 2, 3 y 4	100

Capítulo 10. Anexos

Tabla 42	Tratamientos y simbología de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	113
Tabla 43	Parámetro de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	113

Tabla 44	ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	113
Tabla 45	Conclusiones de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	113
Tabla 46	Tratamientos y simbología de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	114
Tabla 47	Parámetro de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	114
Tabla 48	ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	114
Tabla 49	Conclusiones de ANOVA para diferencia en PDI al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles	114
Tabla 50	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH	115
Tabla 51	Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH	115
Tabla 52	ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH.	115
Tabla 53	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH.	115
Tabla 54	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH	116
Tabla 55	Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH	116
Tabla 56	ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH.	116
Tabla 57	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH.	116
Tabla 58	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH	117
Tabla 59	Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH	117
Tabla 60	ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH.	117
Tabla 61	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH.	117
Tabla 62	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 7.5% de MBA a diferentes pH	118
Tabla 63	Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 7.5% de MBA a diferentes pH	118

Tabla 64	ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 7.5% de MBA a diferentes pH.	118
Tabla 65	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 7.5% de MBA a diferentes pH	118
Tabla 66	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	119
Tabla 67	Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	119
Tabla 68	ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	119
Tabla 69	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	119
Tabla 70	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	120
Tabla 71	Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	120
Tabla 72	ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	120
Tabla 73	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	120
Tabla 74	Tratamientos y simbología de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH.	121
Tabla 75	Parámetro de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH	121
Tabla 76	ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH	121
Tabla 77	Conclusiones de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH	121
Tabla 78	Tratamientos y simbología de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH	122
Tabla 79	Parámetro de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH.	122
Tabla 80	ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH	122
Tabla 81	Conclusiones de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH	122
Tabla 82	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	123
Tabla 83	Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	123
Tabla 84	ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	123
Tabla 85	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H	123
Tabla 86	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI	124

Tabla 87	Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI	124
Tabla 88	ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI . . .	124
Tabla 89	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI	125
Tabla 90	Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de MTX sódico en agua	125
Tabla 91	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido	126
Tabla 92	Parámetro de ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido	126
Tabla 93	ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido	126
Tabla 94	Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido.	126
Tabla 95	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta	127
Tabla 96	Parámetro de ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta.	127
Tabla 97	ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta . .	127
Tabla 98	Conclusiones de ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta.	127
Tabla 99	Ecuación y parámetros de linealización de la curva de curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M	128
Tabla 100	Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de citratos ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.1 M	128
Tabla 101	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	129
Tabla 102	Parámetro de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	129
Tabla 103	ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	129
Tabla 104	Conclusiones de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	129
Tabla 105	Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro R del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	130
Tabla 106	Parámetro de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	130
Tabla 107	ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro R del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	130
Tabla 108	Conclusiones de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro R del modelo <i>Peppas-Sahlin</i>	130

Índice de figuras

Capítulo 2. Antecedentes

Figura 1	Estructura de un nanogel; y un gel macroscópico	3
Figura 2	Reacción de polimerización en la que cadenas poliméricas cortas (2a), que generan microgeles, cuya interacción culmina en la formación de macrogeles	4
Figura 3	Formación de nanogeles mediante polimerización por emulsión	5
Figura 4	Formación de nanogeles a través de la repulsión de grupos cargados.	5
Figura 5	Operación de un espectrómetro de IR	7
Figura 6	Funcionamiento de DLS para determinar el diámetro hidrodinámico; y Ecuación de <i>Stokes-Einstein</i>	8
Figura 7	Ecuación de <i>Rayleigh</i> ; y Gráfico de <i>Debye</i> para determinar peso molecular	8
Figura 8	Rayos de electrones incididos en: SEM; y en TEM	9
Figura 9	Orientación de núcleos: sin campo magnético; con campo magnético; y un equipo de RMN.	10
Figura 10	Expresión de la ley de <i>Newton</i> ; y comportamiento gráfico en fluidos <i>Newtonianos</i> en τ vs $\dot{\gamma}$; y c) μ vs $\dot{\gamma}$	11
Figura 11	Comportamiento de μ vs $\dot{\gamma}$ en: fluido pseudoplástico, y fluido dilatante; τ vs $\dot{\gamma}$; en fluido plástico; y μ vs tiempo en: fluido tixotrópico y fluido reopéctico	12
Figura 12	Desfase de la deformación con respecto al esfuerzo (δ) en ensayos dinámicos oscilatorios; y Ecuaciones del G^* , G' y G''	13
Figura 13	Estrategias no convencionales para la liberación farmacéutica: sistemas de liberación prolongada o retardada, sistemas de liberación modulada por activación, sistemas vectorizados	14
Figura 14	Perfil de liberación en un sistema de liberación inmediata y uno de liberación prolongada	15
Figura 15	Sistemas de liberación matriciales o monolíticos con: fármaco soportado dentro de él; y en su superficie.	16
Figura 16	Expresión de la primera ley de <i>Fick</i> ; y Segunda ley de <i>Fick</i>	16
Figura 17	Mecanismo del hinchamiento de nanogeles con polímeros de tipo poliácidos; y polibásicos.	22
Figura 18	Curva binodal y espinodal de sistemas poliméricos termosensibles. Se aprecia los puntos críticos mínimo y máximo: LCST y UCST, respectivamente. Además, se observa la agregación y solvatación de las cadenas poliméricas en un sistema de dos fases y una fase, respectivamente.	23
Figura 19	Fundamento de la turbidimetría para la caracterización de nanogeles sensibles a un estímulo. Se muestra la radiación transmitida y absorbida al pasar a través de una muestra en una celda; y se aprecia la ecuación	

	matemática para el cálculo de T; así como las partes que conforman a un espectrofotómetro.	27
Figura 20	Sistemas farmacéuticos: sin vectorización; y con vectorización pasiva; y activa	28
Figura 21	Cantidad adsorbida contra concentración al equilibrio en isoterma: Tipo I; y Tipo II	30
Figura 22	Teoría de la doble capa en un coloide con carga negativa	32
Figura 23	Funcionamiento de DLS y LDV para determinar el potencial zeta; y Ecuación de <i>Henry</i>	33

Capítulo 5. Metodología experimental

Figura 24	Sistema de tubos empleado para la adsorción de MTX en partículas de nanogel recubierto.	48
Figura 25	Sistema con celdas de <i>Franz</i> modificadas empleado para la liberación de MTX de sistema farmacéutico	50

Capítulo 6. Resultados y discusión

Figura 26	Fórmulas químicas de los componentes seleccionados para la síntesis de nanogel.	53
Figura 27	Determinación de LCST de nanogel compuesto 100% por pNIPAM.	55
Figura 28	Transición de fase en nanogel compuesto 100% por pNIPAM en estado: hinchado; y colapsado.	55
Figura 29	Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 2% de MBA.	56
Figura 30	Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 2% de MBA.	56
Figura 31	Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 5% de MBA.	57
Figura 32	Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 5% de MBA.	57
Figura 33	Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 5% de 1VI y 2 (NV5 2E), 5 (NV5 5E) y 10% (NV5 10E) de MBA.	58
Figura 34	Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 5% de 1VI y 2 (NV5 2E), 5 (NV5 5E) y 10% (NV5 10E) de MBA.	58
Figura 35	Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 7.5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) de MBA	59
Figura 36	Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 7.5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) de MBA	59
Figura 37	Determinación de VPTT a pH de 7 en nanogel NV7.5 2E	61
Figura 38	Determinación de VPTT a pH de 5 en nanogel NV7.5 2E	61
Figura 39	Espectro de IR del NIPAM.	63

Figura 40	Espectro de IR del 1VI	64
Figura 41	Espectro de IR del MBA	64
Figura 42	Espectro de IR del nanogel NV7.52E	65
Figura 43	Espectro 1H NMR para NIPAM	67
Figura 44	Espectro 1H NMR para 1VI.	67
Figura 45	Espectro 1H NMR para MBA.	66
Figura 46	Espectro 1H NMR para nanogel NV7.5 2E.	68
Figura 47	Curva de <i>Debye</i> linealizada para la obtención del peso molecular aparente del nanogel NV7.5 2E.	69
Figura 48	Micrografía SEM que muestra sistemas no polidispersos en nanogel NV7.5 2E a pH 7	70
Figura 49	Micrografía SEM que muestra la morfología y tamaño de nanogel NV7.5 2E a pH 7	70
Figura 50	Titulación potenciométrica inmediata para nanogel NV7.5 2E a 25°C.	72
Figura 51	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{Volumen}$ de NaOH adicionado en la titulación inmediata para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C.	72
Figura 52	$\Delta^2\text{pH}/\Delta^2 \text{Volumen}$ de NaOH de NaOH adicionado ² en la titulación potenciométrica inmediata para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C	73
Figura 53	Valor de α con respecto al pH en la titulación potenciométrica inmediata para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°	73
Figura 54	Titulación potenciométrica de 3 horas para nanogel NV7.5 2E a 25°C	73
Figura 55	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{Volumen}$ de NaOH adicionado en la titulación potenciométrica de 3 horas para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C.	73
Figura 56	$\Delta^2\text{pH}/\Delta^2\text{Volumen}$ de NaOH adicionado ² en la titulación potenciométrica de 3 horas para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C	74
Figura 57	Valor de α con respecto al pH en la titulación potenciométrica de 3 horas para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C	74
Figura 58	Titulación potenciométrica inmediata para nanogel NV7.5 2E a 45°C.	74
Figura 59	Titulación potenciométrica de 3 horas para nanogel NV7.5 2E a 45°C	74
Figura 60	Determinación de LCST de nanogel NV7.5 2E a diferentes valores de pH.	75
Figura 61	Variación de la LCST con respecto al pH en el nanogel NV7.5 2E	75
Figura 62	Distribución de formación de especies de acuerdo con la relación entre pH y pK_a	76
Figura 63	η del nanogel NV7.5 2E a diferentes temperaturas ante la aplicación de una τ	76
Figura 64	Tipos de rotación presentados en las partículas de nanogel ante la aplicación una ω	76
Figura 65	Módulos G' y G'' nanogel NV7.5 2E a diferentes temperaturas ante la aplicación de una ω	78
Figura 66	$\text{Tan}(\delta)$ a diferentes temperaturas ante la aplicación de una ω	78
Figura 67	Estructura molecular del HA sódico	80

Figura 68	Incremento del d_H a medida que se aumenta la cantidad de HA en el recubrimiento	81
Figura 69	Micrografía SEM que muestra partículas de nanogel NV7.5 2E recubiertas con HA.	82
Figura 70	Micrografía SEM que muestra la monodispersabilidad en tamaño y forma de los nanogeles 7.5 2E recubiertos	82
Figura 71	Micrografía SEM que muestra el sobrenadante separado del proceso de centrifugación de los nanogeles NV7.5 2E recubiertos con HA	82
Figura 72	Curva de calibración de la masa de HA y su densidad en una disolución acuosa	83
Figura 73	Curva de <i>Debye</i> linealizada para la obtención del peso molecular aparente del nanogel NV7.5 2E recubierto	85
Figura 74	Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel NV7.5 2E recubierto. . .	86
Figura 75	Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel NV7.5 2E recubierto. . .	86
Figura 76	Curva de <i>Debye</i> linealizada para la obtención del peso molecular aparente del nanogel NV7.5 2E.	88
Figura 77	Alteración en el equilibrio de [MTX] entre el interior y el exterior del sistema	89
Figura 78	Cinética de adsorción de las proporciones molares nanogel:MTX: 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4	90
Figura 79	Isoterma de adsorción del nanogel NV7.5 2E recubierto con MTX a las 6 horas	92
Figura 80	Sistema <i>in vitro</i> en celdas de <i>Franz</i> en diferentes tiempos a lo largo de la determinación	95
Figura 81	Cinéticas de liberación <i>in vitro</i> de MTX en nanogel NV7.5 2E recubierto en diferentes condiciones de pH y temperatura	96
Figura 82	Ajuste de liberación <i>in vitro</i> observada (lila) con modelo <i>Peppas-Sahlin</i> (verde claro) para el medio 1	98
Figura 83	Ajuste de liberación <i>in vitro</i> observada (rosa) con modelo <i>Peppas-Sahlin</i> (azul oscuro) para el medio 2	98
Figura 84	Ajuste de liberación <i>in vitro</i> observada (azul rey) con modelo <i>Peppas-Sahlin</i> (amarillo) para el medio 3	99
Figura 85	Ajuste de liberación <i>in vitro</i> observada (verde aguamarina) con modelo <i>Peppas-Sahlin</i> (rojo) para el medio 4.	99

Capítulo 10. Anexos

Figura 91	Curva de calibración de MTX sódico en agua considerando una absorción máxima en 302.18 nm	123
Figura 92	Curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de fosfatos (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 0.1 M, considerando una absorbancia máxima en 307.11 nm	126

Figura 93 Curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de citratos ($C_6H_8O_7/ Na_3C_6H_5O_7$) 0.1 M, considerando una absorbancia máxima en 302.01 nm 126

Glosario de abreviaturas

1VI	1-vinilimidazol
AIC	Criterio de <i>Akaike</i>
ANOVA	Análisis de varianza
APS	Persulfato de amonio
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
d_H	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DLVO	Teoría de <i>Derjaguin, Landau, Verwy y Overbeeck</i>
DMARDs	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EPR	Efecto de Permeabilidad y Retención Aumentada
F	Constante de difusión de <i>Fick</i>
FTIR	Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transforma de <i>Fourier</i>
G'	Módulo de almacenamiento o elástico
G''	Módulo de pérdida o viscoso
GPS	Cromatografía por Permeación en Gel
HA	Ácido hialurónico
IR	Infrarrojo
KPS	Persulfato de potasio
LCST	Temperatura de solubilidad crítica baja
MBA	N,N'-metilenbisacrilamida
MPS	Sistema fagocítico mononuclear
MSC	Criterio de selección de modelo
MTX	Metotrexato
NIPAM	N-isopropilacrilamida
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
PDI	Índice de polidispersión
R	Constante de relajación
R²	Coefficiente de determinación
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SLS	Dispersión Estática de la Luz
SPS	Metabisulfito de sodio
SSR	Suma de cuadrados
S_w	Grado de hinchamiento
tanδ	Tangente de pérdida
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
T_g	Temperatura de transición vítrea
UCST	Temperatura de solubilidad crítica alta
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

VPTT	Temperatura de transición de fase volumen
γ	Tasa o velocidad de cizalla
z	Potencial zeta
ΔG	Energía libre de <i>Gibbs</i>
ΔH	Entalpía
ΔS	Entropía
μ	Viscosidad
τ	Esfuerzo cortante o de cizalla

Capítulo 1. Introducción

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica y autoinmune, caracterizada por altos grados de destrucción articular,¹ debido a la inflamación de las membranas sinoviales de tipo diartrodial.² Demográficamente, es la afección reumática inflamatoria más frecuente que afecta del 0.5 al 1.0% de la población adulta a nivel mundial;³ incidiendo especialmente en mujeres entre 40 y 60 años de edad.⁴

Los factores etiológicos de este padecimiento sugieren un desbalance entre los procesos de inmunidad celular y humoral;⁵ que conlleva a la formación de un tejido de granulación, invasivo y altamente vascularizado denominado *pannus*,⁶ en el que se han identificado condiciones de acidosis, hipertermia, e hipoxia.⁷

El tratamiento actual para la artritis reumatoide es de tipo paliativo.⁸ Sus objetivos van encaminados al control del proceso inflamatorio y al impedimento de la progresión de la enfermedad. A lo largo del tiempo, la medicación ha ido cambiando constantemente; pasando de utilizar solamente antiinflamatorios no esteroideos y glucocorticoides, al uso de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs, por sus siglas en inglés por; *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*), como el metotrexato (MTX), que es en la actualidad, el tratamiento de primera elección.⁹ Desafortunadamente, estas terapias no han sido completamente satisfactorias. Por un lado, los objetivos buscados sólo se han conseguido en una pequeña proporción de pacientes,¹⁰ además de los múltiples efectos adversos que generan; como el daño hepático y medular,¹¹ que afectan su calidad de vida. Esto se debe, en parte a la falta de especificidad de la mayoría de los principios activos hacia un tejido diana y un alto grado de distribución sistémica que, junto con su rápida eliminación, propician a la aplicación frecuente de dosis altas.

Para superar estas limitaciones terapéuticas, los sistemas farmacéuticos vectorizados resultan prometedores, ya que llevan al principio activo selectivamente al sitio de inflamación; lo que podría mejorar su eficacia, reducir su biodistribución, conducir a una reducción de las dosis empleadas y generar una disminución en los daños colaterales. Las estrategias de vectorización favorecen la acumulación de un sistema en determinada zona fisiológica, sin embargo, para poder aumentar la concentración del fármaco en estos sitios, es necesario asegurar que su liberación sea única y exclusivamente en las células o los tejidos enfermos. Esto se logra mediante el uso de sistemas modulados por activación ante un estímulo, en los que se explotan los cambios fisiológicos generados por la enfermedad. Gracias al comportamiento de algunos materiales, que sufren modificaciones estructurales o moleculares ante determinadas condiciones, se pueden diseñar acarreadores capaces de contener al fármaco y liberarlo exclusivamente en el entorno patológico.

El desarrollo de la artritis reumatoide trae consigo características especiales en el microambiente de los tejidos dañados, los cuales pueden ser aprovechados para la generación de sistemas farmacéuticos vectorizados de liberación modulada por activación.

En primera instancia, muchos estudios han descrito que las articulaciones inflamadas presentan una población aumentada de fibroblastos y macrófagos sinoviales,¹² los cuales sobre-expresan receptores superficiales como el CD44, una glicoproteína multiestructural que se encuentra en la superficie de varias células.¹³ La estructura múltiple natural del CD44 tiene influencia en un amplio repertorio de ligandos, siendo el ácido hialurónico el más afín.¹⁴ Por otro lado, se sabe que la artritis reumatoide, viene acompañada de una disminución del pH, pasando de 7.4 en tejidos sanos a 5 en tejidos artríticos.¹⁵ Además, que el tejido articular dañado puede alcanzar temperaturas cercanas a 40°C, cuando los valores en tejidos sanos oscilan entre 36.5 y 37.2°C.¹⁶

La investigación actual, se ha enfocado en el desarrollo de sistemas farmacéuticos de tamaño nanométrico, que contienen y protegen al principio activo, para conducirlo a distintas partes del organismo. Entre los nanoacarreadores, los nanogeles han cobrado gran interés, ya que pueden sintetizarse a partir de materiales poliméricos que además de ser biocompatibles; son sensibles a diversos estímulos, lo cual les permite controlar la liberación del activo que contienen, además que poseen características especiales; como una gran estabilidad dentro y fuera del organismo, un alto contenido en agua y una mayor área superficial, que favorece su funcionalización.

El uso de los nanogeles como formas farmacéuticas, junto con las estrategias de vectorización y el uso de materiales estímulo-sensibles, representan una alternativa interesante que pudiera llegar a solucionar los problemas de los tratamientos médicos actuales. Es por ello, que con este trabajo se busca desarrollar un sistema que contenga un fármaco antirreumático y sea capaz de conducirlo y liberarlo exclusivamente en las articulaciones inflamadas.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Geles, microgeles y nanogeles

Los geles son redes macroscópicas que se forman por el entrecruzamiento físico o químico de algunas macromoléculas. Una de sus características es su afinidad a ciertos disolventes, lo cual les permite hincharse, sin disolverse.¹⁷ Esto debido a un efecto sinérgico, en el que la estructura del gel retiene al disolvente y el disolvente le da soporte al gel.¹⁸ Un tipo especial de gel, es el hidrogel, que como su nombre lo indica emplea al agua como disolvente. Usualmente, la estructura de los hidrogeles se basa en materiales poliméricos, por lo que los monómeros son la unidad básica que los compone. El método de síntesis más usado para la obtención de hidrogeles es la polimerización, a través de radicales libres.¹⁹ La formación de radicales libres es posible en la mayoría de los casos, debido a la estructura vinílica de los monómeros. Estos dobles enlaces se rompen al emplear precursores químicos o tratamientos térmicos y radiactivos.²⁰ La presencia de monómeros inestables favorece la generación de largas cadenas poliméricas que pueden entrecruzarse y formar redes entre ellas. Esta propagación finaliza cuando ya no quedan más grupos vinílicos por reaccionar o por la adición de algunas sustancias que actúan como inhibidores.¹⁹

El proceso de polimerización puede focalizarse,²¹ a través de ciertas modificaciones en los métodos de síntesis¹⁷ para generar partículas poliméricas individuales²² y estables,¹⁷ denominadas microgeles, que no son más que dispersiones coloidales.²³ Los coloides son sistemas dispersos heterogéneos compuestos por partículas que tienen un tamaño menor a $1\ \mu\text{m}$.²² Debido a que el diámetro de los microgeles puede llegar a ser menor a $1\ \mu\text{m}$, se ha optado por emplear el término de nanogel. Esto a pesar de que la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, por sus siglas en inglés) acuñe el término “nano” únicamente a partículas que miden entre 1 y 100 nm.²⁴

2.2 Propiedades de los nanogeles

Los nanogeles conservan las propiedades típicas de los coloides, tales como el efecto *Faraday-Tyndall* y el movimiento *Browniano*.²⁵ El efecto *Faraday-Tyndall* ocurre cuando un haz de luz se visibiliza al hacerlo pasar a través de una disolución coloidal. Esto sucede porque las partículas tienen el tamaño suficiente para dispersarla.²⁶ El efecto *Faraday-Tyndall* va de la mano con el movimiento *Browniano*, un movimiento aleatorio de las partículas

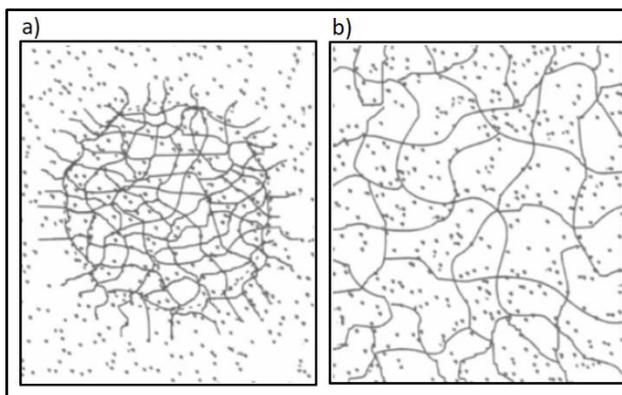


Figura 1. Estructura de a) un nanogel; y b) un gel macroscópico

coloidales²⁵ que se da como resultado del balance entre las fuerzas de atracción y repulsión que hay entre ellas.²⁷ Este equilibrio de fuerzas, les otorga a los coloides una gran estabilidad.²² Las fuerzas de atracción predominantes son básicamente las de *Van der Waals*, en tanto que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a los coloides, como se verá más adelante.²⁷ Gracias a esta estabilidad, los sistemas coloidales son capaces de conservar su estructura aún después de liofilizarse y centrifugarse.²² Algunas veces, cuando predominan las fuerzas de atracción entre las partículas, éstas pueden llegar a aglomerarse.²⁷ Una de las ventajas que los nanogeles presentan sobre otros coloides, es que son menos aglomerables, debido a las cargas eléctricas que soportan sobre su superficie, producto de las cadenas colgantes que poseen.²² Otra característica adicional, es la capacidad que tienen para hincharse en un disolvente, sin perder su forma;¹⁷ a diferencia de los geles macroscópicos, en el que el grado de hinchamiento está limitado, debido a los altos grados de entrecruzamiento que poseen.²² En la Figura 1 se puede apreciar la estructura de un microgel (1a) y un gel macroscópico (1b). Ambos sistemas presentan un entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas que los conforman, sin embargo, los nanogeles tienen una forma definida.

2.3 Mecanismos de formación de los nanogeles

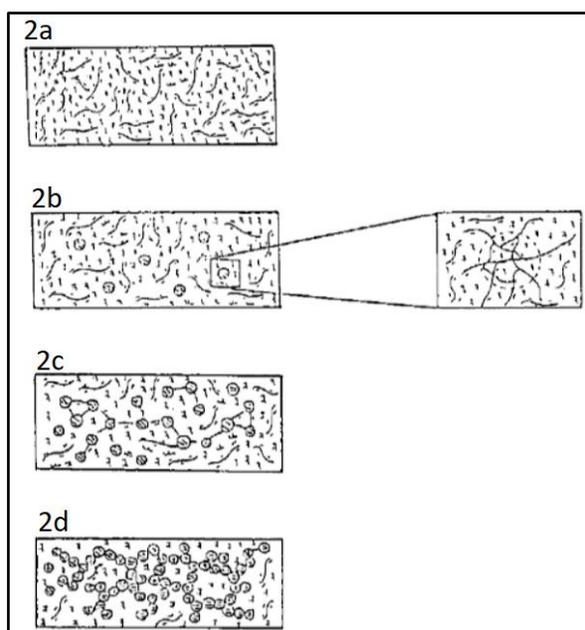


Figura 2. Reacción de polimerización en la que cadenas poliméricas cortas (2a), generan microgeles (2b), cuya interacción (2c) culmina en la formación de macrogeles (2d)

La formación de los nanogeles es el resultado de una reacción de macrogelación incompleta.²⁸ La Figura 2 muestra la evolución de una polimerización que da lugar a un macrogel.²⁹ Esta reacción consta de una fase inicial en la que se forman cadenas poliméricas cortas (2a), las cuales pueden crecer en longitud o generar entrecruzamientos intramoleculares que dan lugar a los nanogeles (2b). En este punto existe una gran cantidad de partículas de nanogel, lo que facilita las interacciones intermoleculares (2c) que constituyen al macrogel (2d).

La obtención de nanogeles a partir de una reacción de macrogelación es una condición transitoria,³⁰ por lo que es muy difícil aislarlos,²⁸ sin embargo, es posible favorecer los entrecruzamientos

intramoleculares entre las cadenas poliméricas que los generan, y al mismo tiempo, minimizar las interacciones intermoleculares subsecuentes en el curso de la reacción.³⁰ Esto se logra al diluir el medio en el que ocurre la polimerización.³¹ Cuando se aumenta el espacio

físico en el que se da la gelación, existe una reducción en la disponibilidad de los monómeros reaccionantes,²⁹ lo cual propicia a que las cadenas poliméricas formadas interactúen entre sí. El aumento sostenido en los entrecruzamientos intramoleculares es tal, que la macrogelación se interrumpe y sólo se forman los nanogeles.²⁸

2.4 Métodos de síntesis de los nanogeles

Históricamente, la polimerización por emulsión ha sido el método más frecuentemente utilizado para la síntesis de nanogeles.³¹ Esta técnica plantea el uso de una mezcla, generalmente acuosa; de monómero, iniciador radicalario y algunos tipos de tensoactivos,²² como el dodecil sulfato de sodio, que es el más empleado.³² Usualmente, los monómeros utilizados suelen ser poco solubles en el disolvente en el que se efectúa la reacción.²² El uso de tensoactivos, además de favorecer la solubilidad del monómero, tiene como propósito la generación de glóbulos que contienen a la reacción en dominios aislados²⁷ y diluidos,²² tal como se aprecia en la Figura 3. La polimerización por emulsión permite la obtención de nanogeles de tamaño y forma uniforme,³² sin embargo, su principal limitación es la dificultad para remover por completo los tensoactivos empleados,³³ los cuales además de ser tóxicos, pueden alterar drásticamente las propiedades químicas del nanogel obtenido.³⁴

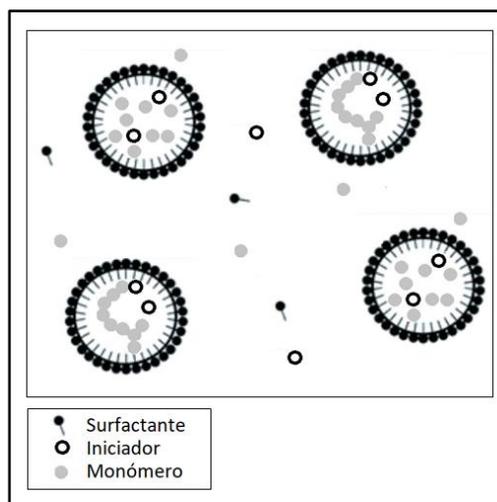


Figura 3. Formación de nanogeles mediante polimerización por emulsión

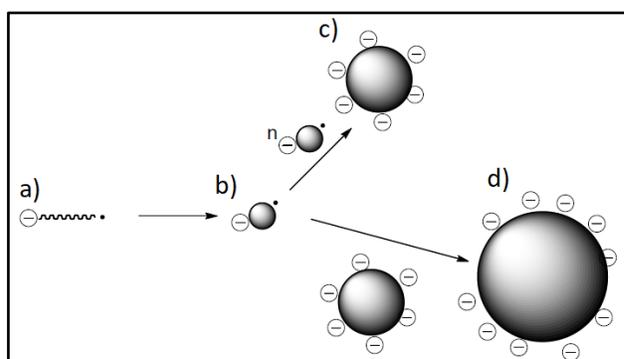


Figura 4. Formación de nanogeles a través de la repulsión de grupos cargados

Para evitar las complicaciones debidas al uso de tensoactivos, en la actualidad han surgido algunos métodos alternos para la síntesis de nanogeles. Una ruta que ha sido ampliamente investigada es la polimerización por precipitación,³⁵ cuyo fundamento se basa en la desestabilización electrostática de partículas poliméricas.³⁶ Este método emplea disoluciones acuosas de un iniciador radicalario y monómeros funcionalizados con grupos cargados,

como los ácidos carboxílicos, las aminas o los sulfatos.³⁴ Su fundamento se muestra en la Figura 4. Al igual que en una macrogelación típica, los monómeros presentes forman cadenas poliméricas (4a), que eventualmente interactúan entre sí para formar núcleos precursores cargados (4b) que crecen a tal grado que coalescen.³⁵ A medida que las

partículas precipitan, la carga electrostática impartida por los monómeros, se concentra en su superficie (4c).²² Conforme los agregados se hacen más grandes, la carga de los sistemas se va incrementando hasta estabilizarse (4d). El crecimiento de las partículas es mediado por su coalescencia, puesto que, al precipitar, su concentración disminuye,³⁷ lo que genera medios diluidos. El producto estable obtenido es el nanogel. A diferencia de la polimerización por emulsión, este método no es tan trivial en cuanto a la uniformidad del tamaño de los nanogeles obtenidos,³⁶ por lo que es necesario ajustar la relación entre la cantidad de agua y monómero que se utilizan.³⁷ Por otro lado, la polimerización por precipitación no permite sintetizar nanogeles que midan menos de 100 nm,³⁰ dado que a menor sea el tamaño de las partículas cargadas, más difícil es lograr estabilizar su carga.³⁵

Una última vía que ha sido explorada para la generación de nanogeles, es a través de la molienda mecánica de un macrogel,³⁸ sin embargo, no suele ser un método que se emplee con frecuencia, debido a la obtención de partículas no tan pequeñas que además tienen una forma irregular.³⁹

2.5 Métodos de purificación de los nanogeles

Independientemente del método utilizado, la síntesis de los nanogeles deja muchos contaminantes que deben ser eliminados para la posterior caracterización y uso de estos sistemas.³⁵ Dentro de los materiales no deseados que se necesitan eliminar se encuentran: cantidades de monómeros que no reaccionaron, cadenas poliméricas cortas que no alcanzaron a formar parte de las partículas, así como residuos de iniciadores, tensoactivos e inhibidores utilizados en la polimerización.⁴⁰ Los métodos de purificación más utilizados son algunos tipos de centrifugación, además del uso de ciertos filtros o membranas de poro pequeño en procesos de microfiltración y de diálisis.¹⁸

La centrifugación es la técnica de separación de materiales dispersos basada en su diferencia de densidad, que se logra a través del movimiento giratorio.⁴¹ Esta operación es útil en la limpieza de nanogeles, dado que permite separar los contaminantes de menor peso molecular. La técnica consiste en la centrifugación del sistema, usualmente a 25,000 rpm durante 45 minutos,⁴⁰ seguida de la redispersión del precipitado obtenido; aunque estos parámetros dependen del tipo de nanogel. La centrifugación se repite hasta que la tensión superficial y densidad de los materiales dispersos se igualan con los del disolvente.³⁵ Una limitación es que, por lo general, los nanogeles suelen tener estos valores casi idénticos a los del agua,²² de manera que resulta complicado recuperar por completo el material. Además, que puede llegar a ser difícil desagregar los precipitados formados, por lo que se debe utilizar la sonicación,⁴⁰ que en algunos casos podría llegar a alterar la estructura del sistema.

En la microfiltración, un material suspendido es forzado bajo presión a atravesar una membrana porosa.⁴² Si el tamaño de poro del filtro es más pequeño que el sistema, el nanogel quedará retenido y sólo pasarán los contaminantes más pequeños. En algunas

ocasiones, el nanogel puede llegar a tapan los poros del filtro, lo que hace al proceso más lento y dificulta la purificación del material.²² La principal desventaja de esta técnica son las grandes pérdidas de material presentadas al despegarlo del filtro.⁴⁰

El proceso de diálisis permite la separación de sustancias a partir de su difusión a través de una membrana porosa.⁴³ Es una técnica que utiliza el gradiente de concentración como fuerza conductora.²³ La purificación de nanogeles puede darse al utilizar bolsas de diálisis con poros pequeños que los retengan y sólo permitan la difusión de los contaminantes solubles. Una limitación de la diálisis es que puede llegar a ser extremadamente lenta cuando las impurezas tienen baja concentración.⁴⁰ Para una mejor separación, es importante verificar que ninguno de los materiales tape los poros de la membrana, por lo que se sugiere que ésta se mantenga en agitación durante todo el proceso.

2.6 Caracterización de los nanogeles

El tipo de caracterización que se realiza a los nanogeles varía de acuerdo con la aplicación para la cual van destinados, sin embargo, entre más extensa sea, mayor conocimiento se tendrá sobre éste. El fin de caracterizar este tipo de sistemas es poder elucidar sus propiedades físicas y químicas, tales como su composición, tamaño, morfología, estructura y comportamiento ante diferentes estímulos.

2.6.1 Espectroscopía de Infrarrojo

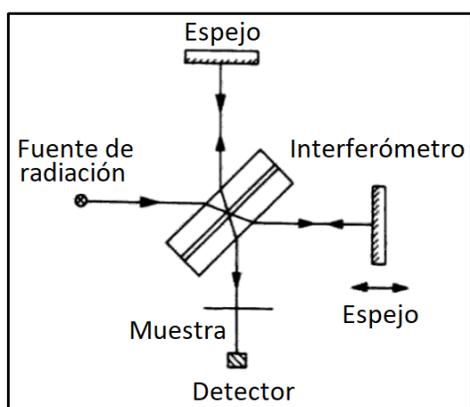


Figura 5. Operación de un espectrómetro de IR

Una de las técnicas espectroscópicas clásicas en el estudio de la naturaleza química de los nanogeles es la de infrarrojo (IR). Como su nombre lo indica, esta espectroscopía usa la radiación de la región de IR; correspondiente a la zona del espectro electromagnético ubicada entre $12,800$ y 10 cm^{-1} ,⁴⁴ para la determinación e identificación de la estructura molecular de las sustancias. Esto a partir de la capacidad que tienen los átomos para absorber la energía radiante, la cual altera la frecuencia y la amplitud de sus vibraciones en la molécula.⁴⁵ Para ello, se emiten radiaciones de IR, que se hacen pasar a través de un interferómetro, el cual divide el haz y

lo refleja en espejos, para generar un patrón de interferencia que posteriormente atraviesa la muestra. La muestra absorbe esta energía y la refleja a un detector,⁴⁴ tal como se aprecia en la Figura 5. La espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de *Fourier* (FTIR, por sus siglas en inglés por; *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) es capaz de recolectar simultáneamente los datos de todas las longitudes de onda de la energía que emite la muestra, de manera que posibilita la rápida obtención de un espectro.⁴⁶ En general, la espectroscopía de IR permite conocer los tipos de átomos y enlaces presentes en una

molécula, particularmente, sus grupos funcionales.⁴⁶ En los nanogeles, esta técnica, brinda información respecto a las uniones entre monómeros o entre monómeros con entrecruzadores, así como la identificación de ramificaciones y grupos terminales en los fragmentos colgantes.⁴⁷ Al igual que en los geles macroscópicos, las señales obtenidas en un espectro de un nanogel, suelen ser gruesas debido al gran peso molecular de éstos.⁴⁵

2.6.2 Dispersión dinámica de la luz

Uno de los métodos más confiables para conocer el tamaño de los nanogeles es la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés por; *Dynamic Light Scattering*), que se basa en el movimiento *Browniano* de los coloides.⁴⁰ El fundamento de esta técnica se aprecia en la Figura 6. Los choques entre las partículas ocasionan que, al hacer pasar un rayo láser de luz monocromático a través de una muestra, ésta se disperse en direcciones diferentes (6a). La intensidad resultante de la luz dispersada es captada por un fotomultiplicador, que es capaz de extraer del ruido las fluctuaciones de la luz dispersada con el tiempo y convertirlo en una curva de decaimiento, a partir de la cual se calcula el coeficiente de difusión traslacional del nanogel (D). Este coeficiente, permite conocer el diámetro hidrodinámico (d_H) de los coloides mediante la ecuación de *Stokes-Einstein* (6b).⁴⁸ DLS es entonces una técnica comparativa, que asigna un d_H a la partícula de la muestra en función a una teórica que se mueve a la misma velocidad, basándose en el hecho que la velocidad del movimiento de las partículas es inversamente proporcional a su tamaño.⁴⁹

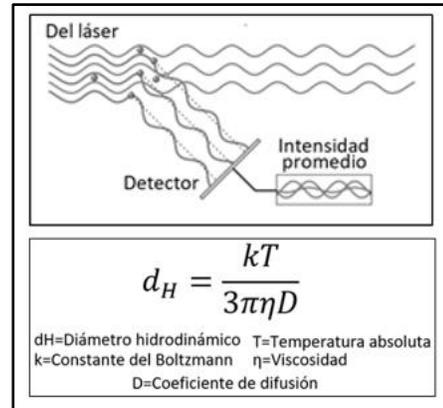


Figura 6. a) Funcionamiento de DLS para determinar el diámetro hidrodinámico; y b) Ecuación de Stokes-Einstein

2.6.3 Dispersión estática de la luz

Un fundamento parecido, es empleado por la dispersión estática de la luz (SLS, por sus siglas en inglés por; *Static Light Scattering*) para la determinación del peso molecular aparente de los materiales, con la diferencia que en esta técnica se toma en cuenta el valor de la intensidad promedio de la luz dispersada que se acumula en un periodo de tiempo.⁴⁸ El proceso para obtenerlo se muestra en la

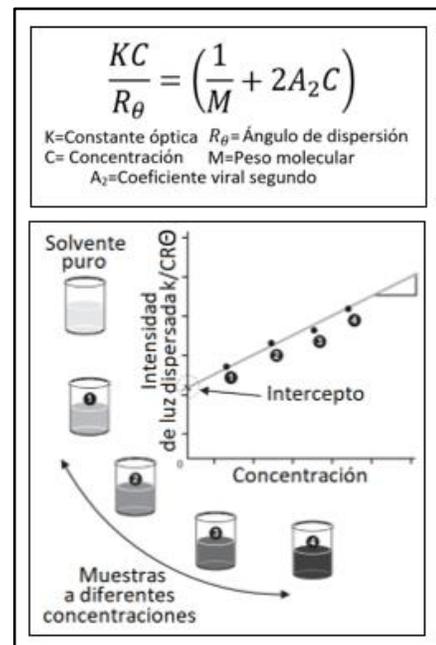


Figura 7. a) Ecuación de Rayleigh; y b) Gráfico de Debye para determinar el peso molecular aparente

Figura 7. Para calcularlo se requieren medir diferentes concentraciones de muestra y la intensidad de luz que dispersan, de acuerdo con la ecuación de *Rayleigh* (7a), Cuando se conoce la intensidad de luz dispersada, se utiliza un gráfico de *Debye*, que la relaciona con el peso molecular promedio (7b).⁴⁹ Esta técnica resulta muy útil para los nanogel, puesto que, a diferencia de los geles macroscópicos, no se puede utilizar la cromatografía por permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés por; *Gel Permeation Chromatography*) ni técnicas de viscosidad, porque los datos que proporcionan corresponderían a la masa total del coloide, puesto que es difícil aislar una partícula individual del nanogel y SLS permite obtener la masa molecular aparente de cada partícula.

2.6.4 Microscopías electrónicas

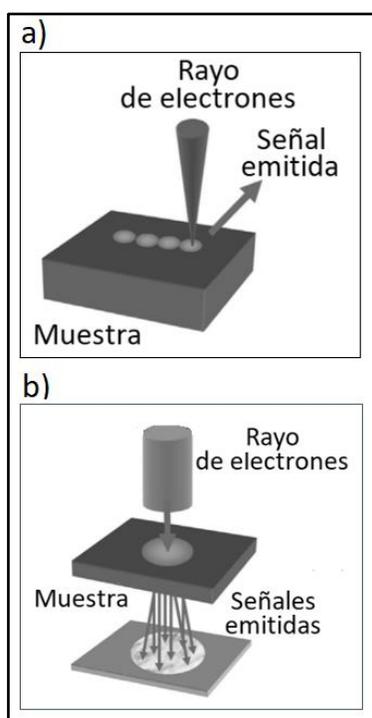


Figura 8. Rayos de electrones incididos en: a) SEM; y en b) TEM

El tamaño de los nanogel puede ser verificado por algunas técnicas de microscopía electrónica como la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés por; *Scanning Electron Microscopy*) o la microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés por *Transmission Electron Microscopy*) que además permiten estudiar otras de sus propiedades, como su morfología, su topografía e incluso su composición química.⁵⁰ Las microscopías electrónicas son capaces de detectar radiaciones con longitudes de onda menores a 1 Å, alcanzando resoluciones atómicas.⁵¹ Para su funcionamiento, se basan en la interacción de los electrones con la materia. Para ello se hace pasar un haz de electrones, denominados electrones primarios, a través de una muestra. Cuando los electrones interactúan con ésta, se emiten electrones secundarios, los cuales son resultado de una interacción de tipo elástica o inelástica.⁵⁰ Las interacciones elásticas mantienen la energía de los electrones primarios incidentes, pero sufren una alteración en su dirección. Mientras que, en las inelásticas, los electrones secundarios presentan una pérdida energética, además del cambio en su dirección. Por otro lado, la muestra excitada emite otros

tipos de radiaciones, como los rayos X. Todas estas interacciones son las señales que permiten caracterizar a un sistema.⁵¹

En SEM, sólo se puede estudiar la superficie de un material. Esto, porque los electrones primarios incidentes se enfocan en sólo un punto de la muestra, por lo que se emite una única señal de baja energía.⁵² En cambio, con TEM, el haz de electrones es propagado, atravesando un área específica de la muestra y emitiendo una serie de señales de electrones difractados, además de rayos X; por lo que tiene la capacidad de analizar con

precisión la estructura interna de una sustancia.⁵¹ En ambas microscopías estas señales se colectan y se sincronizan para modular pixeles. Todos los pixeles generados se combinan para formar una imagen completa.⁵⁰ El equipo de microscopía electrónica consta de una fuente de electrones, un ánodo que los acelera, lentes electromagnéticas para enfocarlos, una cámara de vacío y detectores para recolectar las señales emitidas,⁵² tal como se aprecia en la Figura 8 para SEM (8a) y TEM (8b).

Usualmente, para el estudio de los nanogel, se suele utilizar con más frecuencia SEM, dado que brinda información suficiente sobre los defectos de su superficie. Debido a que los nanogel suelen ser materiales no cristalinos y los monómeros que los componen son generalmente compuestos orgánicos, no es muy común utilizar el análisis por rayos X que brinda TEM.

2.6.5 Resonancia magnética nuclear

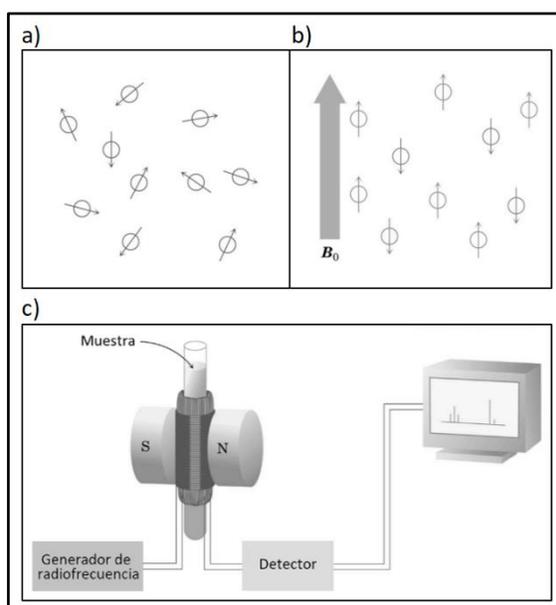


Figura 9. Orientación de núcleos: a) sin campo magnético; b) con campo magnético; y c) un equipo de RMN

La resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés por; *Nuclear Magnetic Resonance*) es la técnica basada en las propiedades magnéticas de la materia, que permite elucidar la estructura molecular de una sustancia.⁵³ Para ello, estudia a los núcleos atómicos que, al ser magnéticamente activos, poseen espín. Esto dado que presentan un número impar de protones o neutrones.⁵⁴ El comportamiento de los espines se aprecia en la Figura 9. En ausencia de un campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar (9a). Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo adquieren su misma dirección (9b), en un estado de mínima energía llamado espín α . Por otro lado, los núcleos con espín negativo

se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía que se denomina espín β .⁵⁵ Cuando una muestra se irradia con radiación electromagnética, los núcleos de espín α son promovidos al estado de espín β . Pero en ausencia de ésta vuelven a su estado inicial.⁵⁴ Cuando esto ocurre, emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia energética entre los estados α y β .⁵³ Esta frecuencia es cercana a los 300 MHz, por lo cual es una radiofrecuencia.⁵⁵ Cuando una muestra se irradia con radiofrecuencias, los espines de los núcleos interactúan con la componente magnética de la radiación y la muestra la absorbe. A esto se le denomina condición de resonancia y se da cuando la frecuencia de la radiación emitida coincide con la frecuencia de giro de los núcleos.⁵⁶

El espectrómetro (9c) empleado en NMR se compone de un imán estable que genera un campo magnético preciso, un trasmisor de radiofrecuencias, así como un detector para medir la energía que absorbe la muestra.⁵³ La técnica de NMR, también permite el estudio de espectros en dos dimensiones, en técnicas como la espectroscopía de correlación (COSY del inglés; *Correlation Spectroscopy*), la espectroscopía de orden difusa (DOSY, del inglés; *Diffusion Ordered Spectroscopy*) o la espectroscopía nuclear del efecto *Overhauser* (NOESY, del inglés; *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) en donde se incluye un tiempo de variable en la secuencia de pulsos para obtener una correlación de núcleos a través del espacio.⁵⁵ Todas estas técnicas de resonancia son aplicables para el estudio de los nanogeles, pues permiten el análisis de los monómeros que los componen, las secuencias entre ellos, así como su estructura, permitiendo definir la tacticidad de sus ramificaciones.

2.6.6 Reología

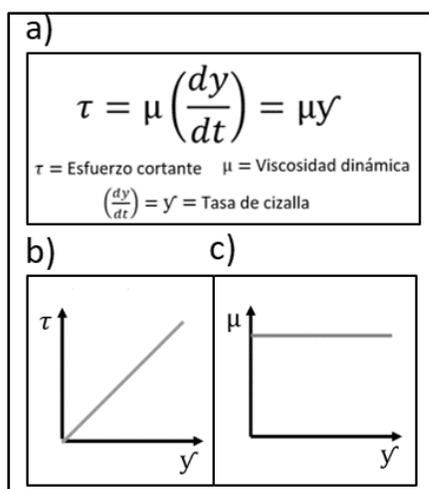


Figura 10. a) Expresión de la ley de Newton; y comportamiento gráfico en fluidos *Newtonianos* en b) τ vs γ ; y c) μ vs γ

Como se ha mencionado anteriormente, los nanogeles presentan una gran afinidad con el disolvente en el que se encuentren dispersos que por lo general es agua. Más adelante se discutirá, que, dependiendo de su composición, se puede favorecer o desfavorecer esta interacción. Para conocer el grado de interacción de los polímeros con el disolvente, en los geles macroscópicos se utiliza el hinchamiento de su estructura como parámetro de medición. Un polímero entrecruzado es capaz de incrementar su volumen muchas veces al absorber grandes cantidades de disolvente. Este hinchamiento puede ser correlacionado con densidad de entrecruzamiento del material. Para obtenerlo, basta con monitorear una masa del gel en presencia de disolvente a través del tiempo. En el caso de los nanogeles, resulta difícil realizar esta determinación, dado que éstos se encuentran en dispersión.

La técnica utilizada para conocer el grado de entrecruzamiento y estudiar la estructura de un nanogel es la reología. La reología estudia el comportamiento de los fluidos cuando son sometidos a un esfuerzo. Los fluidos son sustancias que, debido a su poca cohesión intermolecular, carecen de forma propia, por lo que los nanogeles en dispersión pueden ser considerados como tal. Aunque la fluencia es la característica que los define, los fluidos presentan una variación en su tendencia a fluir.⁵⁶ La viscosidad (μ) es la propiedad que determina el flujo de los fluidos, pues es una medida de la fricción interna que surge cuando se presentan gradientes de velocidad.⁵⁷ Se define como la razón del esfuerzo cortante o cizalla (τ) y la tasa o velocidad de cizalla durante el flujo (γ), donde el esfuerzo cortante es

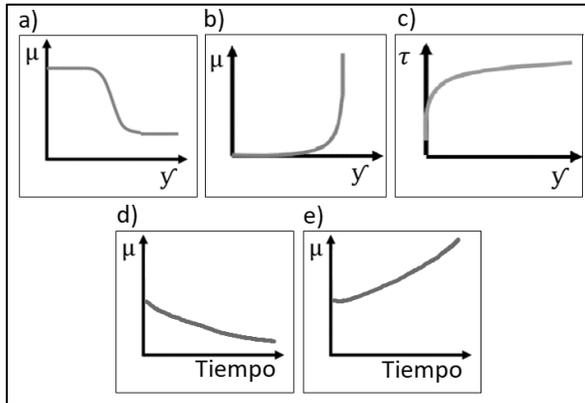


Figura 11. Comportamiento de μ vs γ' en: a) fluido pseudoplástico, y b) fluido dilatante; τ vs γ' en c) fluido plástico; y μ vs tiempo en: d) fluido tixotrópico y e) fluido reopéctico

la fuerza de fricción ejercida por el fluido en una unidad de área; y la tasa de cizalla es el gradiente de velocidad perpendicular a la dirección de flujo, como se aprecia en la Figura 10.⁵⁸ Cuando esta relación es lineal, se sigue la ley de *Newton* (10a), por lo que los fluidos con este comportamiento se denominan *Newtonianos*. En este tipo de fluidos la viscosidad se mantiene constante (10b y 10c).⁵⁶ En los fluidos no *Newtonianos*, la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación no es lineal, por lo que la viscosidad cambia.⁵⁷ Cuando la

viscosidad depende del esfuerzo de corte, pero no de su duración, se habla de tres tipos de fluidos: pseudoplásticos, dilatantes y plásticos. En los fluidos pseudoplásticos, la viscosidad decrece a medida que la velocidad de cizalla aumenta, generando un efecto de adelgazamiento (11a). Por el contrario, en fluidos dilatantes, la viscosidad aumenta si la velocidad de corte se incrementa, y aquí existe un engrosamiento (11b). Los fluidos plásticos presentan un valor de esfuerzo cortante llamado cedencia, a partir del cual pueden fluir (11c). En otros fluidos no *Newtonianos*, sus propiedades reológicas dependen de la duración del esfuerzo cortante aplicado. Estos pueden ser tixotrópicos (11d) o reopécticos (11e) cuando la viscosidad decrece con el tiempo ante una velocidad de cizalla constante o viceversa, respectivamente.⁵⁸ El comportamiento gráfico de estos fluidos se muestra en la Figura 11.

Otra propiedad reológica es la viscoelasticidad, la cual determina la deformación que experimenta un material cuando se somete a un esfuerzo y temperatura a través del tiempo. Como su nombre lo sugiere, implica una combinación entre la viscosidad y la elasticidad.⁵⁷ Un material completamente elástico, regresa a su forma original al retirar el esfuerzo aplicado. En cambio, en uno viscoelástico, la deformación aumenta gradualmente a través del tiempo bajo el esfuerzo aplicado. Cuando se retira el esfuerzo, el material no regresa inmediatamente a su forma original, sino que la deformación decae gradualmente.

Los métodos de medición de las propiedades reológicas de los fluidos se realizan mediante ensayos dinámicos,⁵⁶ a través de un reómetro oscilatorio, el cual consta de un plato, cono o cilindro que oscila a determinada frecuencia y amplitud.⁵⁹ En este tipo de experimentos la deformación aplicada varía sinusoidalmente con el tiempo, como se ve en la Figura 12, mientras que el esfuerzo cambia con la misma frecuencia, pero presentando un desfase con respecto a la deformación (δ) (12a).⁵⁶ A partir del valor de desfase y los valores máximos de cizalla y esfuerzo de cizalla se calcula un módulo complejo (G^*) del que se derivan el módulo de almacenamiento G' y el de pérdida G'' (12b), los cuales dan información sobre la fracción

viscosa y la elástica de un material, por lo que también se denominan módulo elástico y viscoso, respectivamente. El módulo G' refiere a la parte que está en fase con la deformación y es una medida de energía almacenada elásticamente durante un ciclo; mientras que el módulo G'' es la parte que está desfasada y da una medida de la energía que es disipada en un ciclo.⁵⁹

Para evidenciar la rapidez del corte sinusoidal, como consecuencia del movimiento oscilatorio en un fluido, se obtiene la viscosidad compleja (η^*), la cual está conformada por una parte real y una imaginaria que incluye a G^* . Razón por la cual, muchas veces el valor de η^* suele ser un poco diferente de μ .

La necesidad del estudio de las propiedades reológicas en un nanogel se da, debido a que, por un lado, existe una proporcionalidad inversa entre la viscosidad y el grado de entrecruzamiento de la estructura. Por otra parte, cuando el esfuerzo cortante diverge hasta cierto punto, las partículas de nanogel se acercan tanto que presentan un empaquetamiento de esferas duras por lo que presentan ciertas propiedades elásticas.⁵⁸

2.7 Nanogeles como sistemas de liberación farmacéutica

Las propiedades físicas y químicas de los nanogeles les permiten ser utilizados en muchas aplicaciones. Algunas de ellas dentro del campo biológico, tales como en el desarrollo de sistemas de liberación farmacéutica, en ingeniería de tejidos, en la construcción de biosensores, en la separación y purificación de proteínas y hasta en la secuenciación de material genético;⁶⁰ además de otras áreas, como en el diseño de materiales ópticos y en catálisis.⁶¹ Pero sin duda alguna, el campo farmacéutico ha sido uno de los más explorados, dada la marcada necesidad para el mejoramiento y el desarrollo de medicamentos más eficaces y menos tóxicos, sobre todo en aquellas enfermedades crónicas, en las que los pacientes se someten a terapias de por vida.

Para poder ser administrado al organismo, el fármaco debe estar contenido en lo que se conoce como una forma farmacéutica, una disposición individualizada que lo combina con excipientes, con el fin de proveer una correcta dosificación, así como facilitar su administración al cuerpo y asegurar su conservación. Los sistemas convencionales que se utilizan en la industria farmacéutica presentan numerosas desventajas, siendo la más

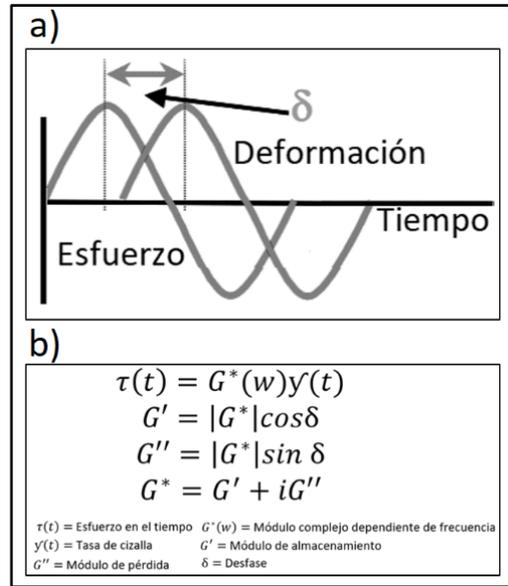


Figura 12. a) Desfase de la deformación con respecto al esfuerzo (δ) en ensayos dinámicos oscilatorios; y b) Ecuaciones del G^* , G' y G''

crítica; su no especificidad, lo que se ve reflejado en múltiples efectos secundarios y adversos con los que los pacientes tienen que lidiar.

Para poder superar estas complicaciones, la tecnología farmacéutica se ha dado a la tarea de incluir estrategias no convencionales en la fabricación de los medicamentos, las cuales se esquematizan en la Figura 13. Esto mediante el uso de materiales inteligentes, que permiten modificar la liberación de los fármacos, pudiendo alterar su velocidad; en una liberación retardada o prolongada (13a); además de localizarla en un sitio fisiológico específico, a través de sistemas modulados por activación (13b) o con sistemas vectorizados (13c).⁶²

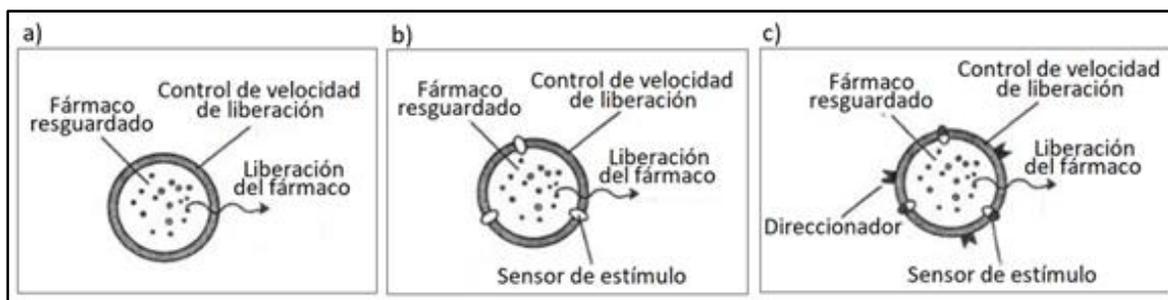


Figura 13. Estrategias no convencionales para la liberación farmacéutica: a) sistemas de liberación prolongada o retardada, b) sistemas de liberación modulada por activación y c) sistemas vectorizados

Los sistemas farmacéuticos son un análogo a la forma farmacéutica, pues representan los vehículos o acarreadores que contienen al fármaco y permiten administrarlo al organismo, para después liberarlo de manera controlada. Los más explorados son los sistemas coloidales de tipo nanométrico, cuyo tamaño modifica su biodistribución, permitiéndole alcanzar sitios inaccesibles o complejos, además que, debido a su mayor área superficial, se posibilita su fácil funcionalización y favorece el resguardo de mayores cantidades de principio activo.

Son variados los tipos de coloides nanométricos que se pueden emplear como sistemas farmacéuticos; como los liposomas, niosomas o nanopartículas poliméricas o inorgánicas,⁶³ pero todos presentan algunas complicaciones que van desde su falta de inocuidad, poca estabilidad dentro y fuera del organismo y dificultad en los procesos de preparación. Es por ello, que, los nanogeles constituyen un sistema útil para este fin, debido a sus características físicas y químicas únicas. En primera instancia, su composición, puede incluir el uso de polímeros biocompatibles y biodegradables, que les permiten permanecer en el organismo, sin causarle daño y eliminarse fácilmente de él, además que pueden reaccionar inteligentemente ante ciertos estímulos. Por otro lado, su capacidad de hinchamiento ante estímulos les posibilita controlar la liberación del fármaco mediante mecanismos de difusión. Adicionalmente, los nanogeles son estables coloidal y mecánicamente, lo cual restaría problemas en su almacenamiento antes de administrarlo. Finalmente, las operaciones necesarias para su síntesis son fácilmente escalables, por lo que resultarían ideales para acoplarse en procesos industriales.²²

2.7.1 Nanogeles como sistemas de liberación prolongada

Cuando se administra un medicamento, existe un proceso de liberación del fármaco, en el cual éste sale de la forma farmacéutica que lo aloja. Esta salida puede darse a través de distintos mecanismos, ya sea mediante su difusión a través del acarreador o por la erosión de éste.⁶⁴ Una vez fuera, el fármaco se encuentra disponible para absorberse, de manera que alcanza la circulación sistémica al atravesar membranas biológicas. La cantidad de fármaco en sangre puede cuantificarse a lo largo del tiempo en una curva de concentración plasmática, la cual muestra la ventana terapéutica, que es la zona en la cual el principio activo tiene un efecto sobre el organismo y está delimitada por un valor de concentración efectiva mínima y una concentración efectiva máxima. Por debajo de la concentración efectiva mínima no existe un efecto farmacéutico, mientras que, por arriba de la concentración efectiva máxima, el fármaco puede resultar tóxico, provocando una serie de efectos perjudiciales.⁶⁵

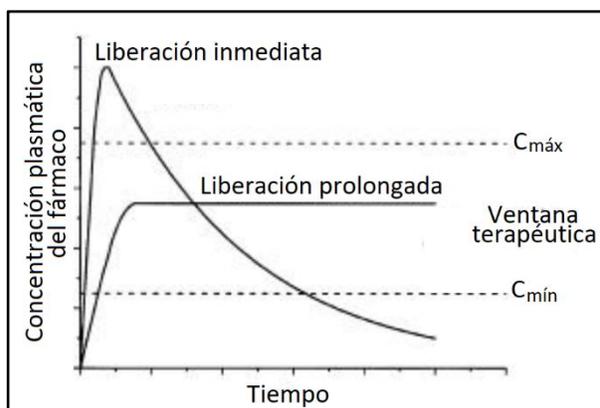


Figura 14. Perfil de liberación en; un sistema de liberación inmediata y uno de liberación prolongada

En los sistemas de liberación convencional, no existe un control sobre la liberación del fármaco, por lo que ésta es inmediata⁶² y no suele superar las 2 horas después de su administración. En estos casos, ya que el principio activo se absorbe, no existe un control en su biodistribución, de manera que puede acceder fácilmente a múltiples zonas fisiológicas y no llega en su totalidad al órgano o tejido de interés, por lo que la eficacia del tratamiento no es la mejor, además que se favorecen los efectos secundarios y adversos. En la Figura 14, se muestra los perfiles de liberación de

algunos sistemas farmacéuticos. La curva clásica de concentración plasmática del principio activo de los medicamentos convencionales suele alcanzar un valor máximo rápidamente, que en poco tiempo tiende a disminuir, debido a su eliminación del cuerpo, en lo que se conoce como una liberación inmediata. Para mantener la concentración plasmática constante a través del tiempo dentro de la ventana terapéutica, se requieren administrar múltiples dosis del medicamento. La principal desventaja de esto es que existen varias fluctuaciones en la concentración del fármaco, además que requiere regímenes farmacéuticos continuos que necesitan la completa adherencia del paciente al tratamiento, lo cual suele ser inconveniente en enfermedades crónicas que requieren la continua medicación.⁶⁶

Para atenuar estas complicaciones, se propone el desarrollo de sistemas de liberación prolongada. Un sistema de liberación prolongada es aquél en donde la liberación del

fármaco se da a velocidades más lentas, por lo que los niveles de concentración terapéuticas del principio activo se mantienen por un periodo que alcanza 12 horas o más. La diferencia substancial con los sistemas de liberación retardada es que, en éstos últimos, existe un tiempo de latencia a partir del cual el fármaco se libera y no precisamente se mantiene su concentración plasmática a lo largo del tiempo.⁶⁵ Los sistemas de liberación prolongada pueden obtenerse mediante reservorios o matrices. Un sistema reservorio o capsular consta de un compartimiento que resguarda al fármaco, de manera que el grado de liberación de éste está en función al tipo de material empleado o el grosor de la membrana, así como de las características fisicoquímicas del principio activo. Por otro lado, los sistemas matriciales o monolíticos están compuestos por un soporte sólido en el cual se encuentra el fármaco homogéneamente disperso.⁶² En este caso, es este soporte el que controla su liberación, de acuerdo con tipo de material que las constituye, lo cual las convierte en matrices inertes, hinchables y erosionables y que a su vez determina el mecanismo de liberación en cuestión.⁶⁷ Los nanogeles entran dentro de la definición de un sistema matricial, pues no es más que un soporte polimérico, como se aprecia en la Figura 15, que contiene al fármaco dentro de él (15a) o en su superficie (15b). Como se ha visto, los nanogeles tienen la capacidad de hincharse. La captación y liberación de fármaco, en los nanogeles, está gobernado por los mecanismos de hinchamiento y deshinchamiento de la estructura, así como de difusión a través de éste. Por esta razón, los modelos más aplicables están basados en las leyes de difusión de Fick.⁶⁸

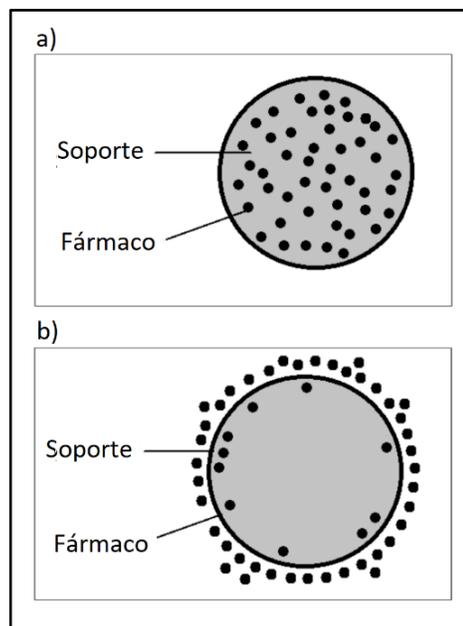


Figura 15. Sistemas de liberación matriciales o monolíticos con: a) fármaco soportado dentro de él; y b) en su superficie

<p>a)</p> $J = -D \frac{dc}{dx}$ <p>J= Flujo molar del fármaco x= distancia difundida en un tiempo t</p>	<p>b)</p> $\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2}$ <p>c=Concentración del fármaco</p>
--	--

Figura 16. a) Expresión de la primera ley de Fick; y b) Segunda ley de Fick

Un sistema con un gradiente de concentración no está en equilibrio, por lo que se origina un fenómeno de transporte para uniformarla, denominado difusión.⁶⁹ Esto a través de un flujo irreversible de materia desde las concentraciones más altas a las más bajas, consecuencia del movimiento aleatorio que tienen las partículas.⁷⁰ Las ecuaciones que rigen estos fenómenos se muestran en la Figura 16. La

primera ley de Fick (16a) gobierna el proceso difusivo de un sistema estacionario, es decir

que no depende del tiempo.⁶⁸ Este principio indica que el flujo difusivo (J) que atraviesa una superficie o distancia difundida en determinado tiempo (x) es proporcional al gradiente de concentración de la materia, al incluir un coeficiente de difusión o difusividad (D).⁷⁰

Para muchos sistemas, la velocidad de liberación varía a lo largo del tiempo. En estos casos, se aplica la segunda ley de *Fick* (16b), que controla un estado inestable, por lo que considera transformaciones en x , pero también toma en cuenta un tiempo (t).⁶⁹

2.7.2 Nanogeles como sistemas de liberación modulada por activación

La falta de control en la biodistribución de los fármacos en la medicación convencional ocasiona que estos alcancen sitios fisiológicos en donde no se desarrolla la enfermedad, generando efectos farmacológicos no deseados, además de la disminución en la eficacia de los tratamientos. Es por ello, que surge el interés de desarrollar sistemas que tengan la capacidad de liberar al fármaco exclusivamente en las zonas patológicas. Una estrategia que cumple este fin es el desarrollo de sistemas modulados por activación,⁶² los cuales tienen la capacidad de liberar al fármaco ante un estímulo interno o externo.

El uso de estos sistemas propicia que el principio activo sólo se libere hasta alcanzar un sitio específico en el cual pueda ejercer su acción. Para esto, se pueden aprovechar las características propias de cada enfermedad, mismas que generan un ambiente a nivel orgánico, tisular o celular diferente, en comparación al presentado en condiciones de salud. Éste es el caso de los estímulos internos que pueden ser; físicos, como la presión osmótica o hidrodinámica y la temperatura; químicos, como el pH, la fuerza iónica, el potencial redox y la concentración de oxígeno; y bioquímicos, como las concentraciones de enzimas o de otros metabolitos.⁷¹

En algunos casos, la patología no genera cambios lo suficientemente sensibles que puedan aprovecharse para la liberación, por lo que se aplican estímulos externos, que usualmente son físicos; como el campo magnético, el eléctrico o el ultrasonido.⁷¹

En cualquiera de los dos casos, la idea de la estrategia es utilizar un material que ante estos ambientes sufra cambios conformacionales o transiciones de fase que provoquen su disolución, hinchamiento, colapso o ruptura y como resultado facilite o complique la liberación del principio activo.

Para lograr un sistema modulado por activación se debe utilizar un material inteligente que responda ante un estímulo. Por lo general se suelen usar polímeros, pero también es viable emplear algunos lípidos, metales u otro tipo de sustancias orgánicas.

Para desarrollar nanogeles modulados por activación se utilizan polímeros inteligentes para conformar su estructura. La liberación del fármaco controlada se obtiene al utilizar al material sensible como soporte, ya sea teniendo al principio activo inmerso o adsorbido en su superficie.

2.7.2.1 Nanogeles sensibles a pH

Las diferencias de pH en el organismo median algunos procesos fisiológicos importantes a nivel orgánico, tisular y celular. El caso más notable que evidencia estas variaciones se observa entre la sangre y los líquidos intracelulares, puesto que el pH de la primera fluctúa entre 7.35 y 7.45; y contrasta con el 7.2 de los líquidos intracelulares. A nivel orgánico, las diferencias de pH más marcadas se presentan en el tracto gastrointestinal, en donde el pH estomacal va de 1 a 2.5 en una condición de ayuno, hasta 5 durante la digestión. Cerca del estómago, en el intestino, el pH fluctúa entre 6.15 y 7.35 en su zona proximal, hasta 5.26 y 6.72 en la parte distal. Al término del tracto, se encuentra el colon, con un pH más básico entre 6.72 y 7.02. La vagina, por su parte, es otro órgano con un ambiente muy diferente al resto del cuerpo, pues es una zona ácida con un pH que puede llegar hasta 4. A nivel tisular, las variaciones son más evidentes en tejidos enfermos, específicamente en los cancerosos y los inflamados. En el caso del cáncer, esto se debe a que la proliferación celular desmedida y desordenada genera una carga inusual de oxígeno, mismo que es insuficiente para la población de células. Como resultado, se produce ácido láctico, que disminuye el pH de la zona hasta 5. Algo similar ocurre en tejidos inflamados, debido a la llegada de leucocitos y otro tipo de células de defensa por los mecanismos de protección del sistema inmune. Finalmente, dentro de las células existen cambios de pH debidos a numerosos e importantes procesos celulares, como, por ejemplo, la fagocitosis, en donde el pH varía de 7.4 en el citosol, a alrededor de 5 en las endosomas y llega hasta 4, en los lisosomas.⁷²

Las múltiples variaciones de pH dentro del cuerpo dan la pauta a que el mismo organismo sea capaz de controlar la liberación de fármacos de acarreadores mediados por activación, y esta activación la otorga la sensibilidad del material al pH. De esta manera el sistema farmacéutico será capaz de contener al principio activo dentro de él cuando se administre en el organismo y al biodistribuirse, pero únicamente lo liberará en la zona patológica que presente las características al que es sensible. Los principales materiales inteligentes para este fin son los polímeros, razón por la cual los nanogeles, son sistemas ideales que pueden fungir como sistemas farmacéuticos modulados por la activación ante un estímulo de pH.

La sensibilidad de los polímeros al pH ocurre debido a que poseen grupos funcionales ionizables. Estos grupos se protonan o desprotonan dependiendo de su pK_a y del pH del ambiente en el que se encuentren, el cual se conoce como pH de transición o pH crítico (pH^*).⁷³ De acuerdo con el tipo de fracción ionizable, los polímeros sensibles al pH pueden ser poliácidos o polianiones y polibases o policationes, tal como se aprecia en la Tabla 1 y Tabla 2.

Como su nombre lo indica, los poliácidos o polianiones son los polímeros que presentan grupos funcionales que se encuentran protonados y neutros, a pH menores a su pK_a ; y desprotonados y en forma aniónica, con un pH arriba de este valor. Los grupos funcionales más comunes de este tipo son los ácidos carboxílicos (T1a), en su forma sin carga: COOH y

Capítulo 2. Antecedentes

Tabla 1. Protonación y desprotonación de poliácidos con a) Ácido carboxílico; y e) Sulfonamida. Se aprecian estructuras de los polímeros con ácidos carboxílicos: b) Ácido poli(acrílico) (PAAc), c) Ácido poli(meta-acrílico) (PMAAc), d) ácido poli(etil-acrílico); y sulfonamidas: f) Sulfadimetoxina (SD) y g) Sulfadimidina (SA); así como los polímeros de origen natural: h) Alginato y i) Ácido hialurónico (HA)

a) Protonación/Desprotonación del ácido carboxílico		
$\left(\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{---C---C---} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{C=O} \\ \quad \\ \quad \text{OH} \end{array} \right)_n \xrightleftharpoons{\Delta\text{pH}} \left(\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{---C---C---} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{C=O} \\ \quad \\ \quad \text{O}^\ominus \end{array} \right)_n$		
b) PAAc	c) PMAAc	d) PEAAc
$\left(\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{---C---C---} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{C=O} \\ \quad \\ \quad \text{OH} \end{array} \right)_n$	$\left(\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{---C---C---} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{COOH} \end{array} \right)_n$	$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{---C---C---} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{COOH} \end{array} \right)_n$
e) Protonación/Desprotonación de sulfonamida		
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NH}-\text{R} \xrightleftharpoons{\Delta\text{pH}} \text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{S}(=\text{O})_2-\text{N}^\ominus-\text{R} + \text{H}^+$		
f) SD	g) SA	
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_3(\text{OCH}_3)_2$	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$	
h) Alginato	i) HA	
$\left[\text{---O---} \left(\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{---C---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{C=O} \\ \quad \\ \quad \text{OH} \end{array} \right) \right]_m \left[\text{---O---} \left(\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{---C---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{C=O} \\ \quad \\ \quad \text{OH} \end{array} \right) \right]_n$	$\left(\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{---O---C---O---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{C=O} \\ \quad \\ \quad \text{NH} \end{array} \right)_n$	

su forma aniónica: COO^- . Los polímeros con ácidos carboxílicos más usados en farmacia son los ácidos poliacrílicos con cadenas alifáticas de diferente longitud (T1b, T1c y T1d). Otro grupo utilizado con frecuencia es el ácido sulfónico; en su forma neutra: SO_3H ; y con carga: SO_3^- , presente en las sulfonamidas (T1e) que están en polímeros con sulfadimetoxinas (T1f) y sulfadimidinas (T1g).

Además de estos polímeros sintéticos, para los sistemas farmacéuticos se suelen utilizar algunos materiales de origen natural, que por lo general son polisacáridos y contienen en su estructura, numerosos grupos ácidos, como ocurre en los alginatos (T1h), la carbometilcelulosa, el ácido hialurónico (HA) (T1i) y la pectina.⁷⁴

El otro tipo de polímeros pH sensibles son las polibases o policationes, que están en estado desprotonado y neutro, cuando el pH del medio es mayor a su pK_a ; o protonados y en forma catiónica, cuando se encuentran en un pH menor. Los polímeros de este tipo presentan grupos funcionales nitrogenados, ya sea en aminas primarias, secundarias o terciarias alifáticas (T2a) o por grupos nitrogenados aromáticos. Los ejemplos clásicos de polibases alifáticas que se emplean para el diseño de sistemas farmacéuticos son el poli(N,N'-dimetilaminoetilmetacrilato) (PDMAEMA) (T2b) y el poli(2-(diethyl-amino)etil-metacrilato) (PDEAEMA) (T2c). En el caso de los grupos nitrogenados aromáticos, se utilizan polímeros con piridinas (T2d), como la poli(2-vinilpiridina) (T2f) y la poli(4-vinilpiridina) (T2g); y en cuanto a los imidazoles (T2e), destaca el uso del poli(N-vinilimidazol) (T2h) y el poli(4-vinilimidazol) (T2i). A diferencia de los poliácidos, no existe una variedad tan amplia de materiales naturales polibásicos que se puedan utilizar en farmacia, pero sí destaca uno muy útil que es el quitosán (T2j).⁷⁴

El criterio de selección del tipo de polímero utilizado para el desarrollo de sistemas farmacéuticos modulados por activación es su pK_a ,⁷² dependiendo del fin para el cual se usará, pero también se debe considerar su compatibilidad con otros materiales, su toxicidad y su capacidad de degradación dentro del cuerpo. Para el desarrollo de nanogeles como acarreadores farmacéuticos sensibles a pH, se utiliza el polímero como soporte para contener al fármaco, de modo que el mecanismo de liberación puede ser mediado principalmente por difusión. Esto porque la protonación y desprotonación de los grupos funcionales de los polímeros, propician al hinchamiento o colapso del nanogel, debido a la entrada y salida de agua de la estructura, lo cual es el resultado de los cambios de conformación en las cadenas poliméricas y las alteraciones en la afinidad hidrofóbica e hidrofílica entre ellas.⁷⁵ El mecanismo de liberación de nanogeles sensibles a pH está en la Figura 17. Tanto en los poliácidos (17a) como en las polibases (17b), la idea es la misma: si el pH del medio favorece las formas ionizadas de los grupos funcionales, es decir; un pH mayor al pK_a , en el caso de los poliácidos; y un pH menor al pK_a , en el caso de las polibases, la estructura polimérica tendrá numerosos grupos con la misma carga electrostática. Las cargas iguales en una estructura pequeña provocan la repulsión entre las cadenas poliméricas del nanogel, lo cual aumenta el espacio entre ellas, facilitando la entrada de

Capítulo 2. Antecedentes

Tabla 2. Protonación y desprotonación de polibases con a) aminas alifáticas; y aminas aromáticas d) piridina y e) imidazol. Se aprecian estructuras de los polímeros ácidos con aminas alifáticas: b) Poli(dimetil-etil-amino-etil-metacrilato (PDMAEMA) y c) Poli(2-(di-etil-amino) etil-metacrilato (PDEAEMA),); piridinas: f) Poli(2-vinil-piridina) y g) Poli(4-vinil-piridina); imidazoles: h) Poli(N-vinil-imidazol) y Poli(4-vinil-imidazol); así como un polímero natural.

a) Protonación/Desprotonación de aminas alifáticas			
b) PDMAEMA		c) PDEAEMA	
d) Protonación/Desprotonación de piridinas		e) Protonación/Desprotonación de imidazoles	
f) Poli (2-vinil-piridina)	g) Poli (4-vinil-piridina)	h) Poli (N-vinil-imidazol)	i) Poli (4-vinil-imidazol)
j) Quitosán			

agua, de manera que se favorece su carácter hidrofílico, implicando un aumento en la presión osmótica dentro de la estructura. Estos fenómenos se traducen en el hinchamiento del nanogel. Si el sistema está cargado con fármaco, pueden ocurrir dos situaciones. En primera instancia, si el fármaco es hidrofílico, se dificultará su difusión a través del nanogel. Esto porque el agua del medio tendrá mayor tendencia a entrar en el sistema. En cambio, si se trata de un principio activo hidrofóbico, su difusión se verá impulsada por la hidrofilia de la estructura.

Cuando el pH del medio es menor al pK_a de los poliácidos; o el pH es mayor al pK_a de las polibases, se favorece el estado neutro de los grupos funcionales, de manera que hay un mayor balance en la carga electrostática del sistema, por lo que no hay repulsión entre las cadenas poliméricas y se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre ellas. Esto genera la salida de agua de los nanogeles, lo cual se ve reflejado en el colapso de la estructura. Si el sistema contiene un fármaco hidrofílico, su salida se verá facilitada durante la transición de fase, así como por la misma hidrofobicidad del sistema. En cambio, si el principio activo es hidrofóbico, no podrá difundir con facilidad, pues será más afín al sistema.^{72, 73,75}

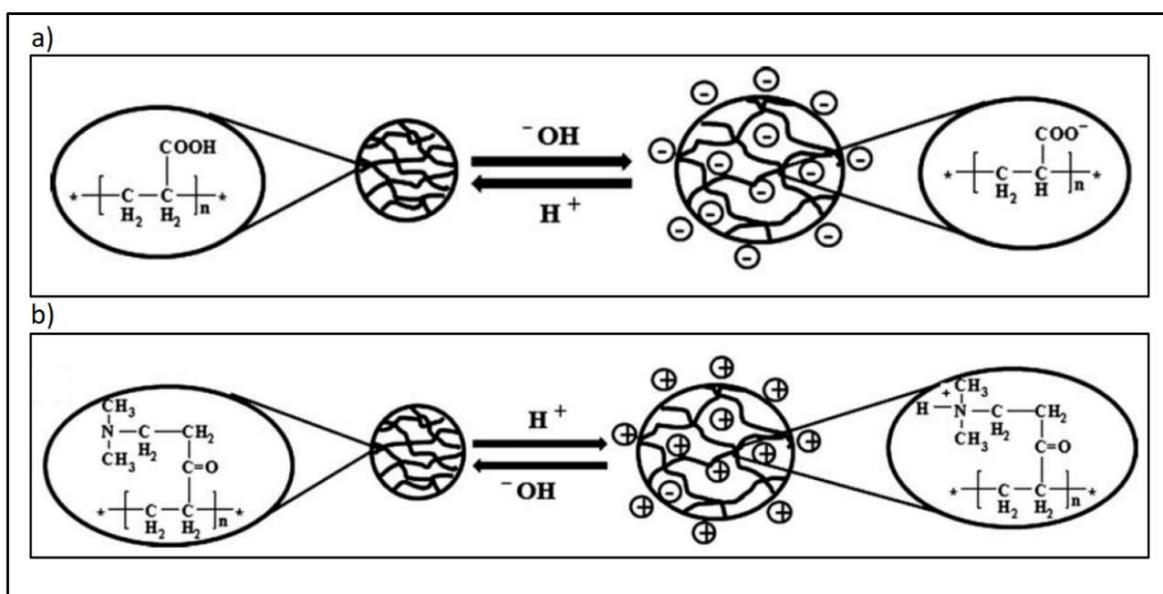


Figura 17. Mecanismo del hinchamiento de nanogeles con polímeros de tipo a) poliácidos; y b) polibásicos.

2.7.2.2 Nanogeles sensibles a temperatura

La temperatura corporal del organismo fluctúa entre los 36.1 y 37.2 °C en condiciones de salud.⁷⁶ A diferencia de lo que ocurre con el pH, no existen variaciones de temperatura tan marcadas, debido a los mecanismos homeostáticos que la regulan rápidamente, porque los cambios drásticos podrían afectar el funcionamiento de las proteínas y enzimas importantes para los procesos fisiológicos. A pesar de esto, algunas condiciones patológicas producen una pequeña variación de temperatura en los tejidos comprometidos. Esto sucede en el cáncer y en enfermedades resultantes de procesos inflamatorios. En ambos

casos, la temperatura en los tejidos afectados puede incrementarse hasta los 40°C. El aumento de temperatura en los tumores cancerígenos se debe a una mayor actividad metabólica, debido a la proliferación celular descontrolada. Por su parte, en los tejidos inflamados, esta alteración es resultado de un mayor flujo sanguíneo en el tejido por la respuesta inmune desencadenada.⁷⁷ El desarrollo de sistemas modulados por la temperatura puede utilizarse para enfermedades que implican aumentos en la temperatura, de modo que el principio activo se libere únicamente en estos ambientes. Los materiales que presentan alteraciones ante una variación de temperatura pueden ser algunos polímeros o lípidos. Pero son los polímeros, los más atractivos en farmacia, debido a que las estructuras lipídicas no presentan una gran estabilidad, pues en muchas ocasiones su permanencia depende de la concentración del medio en que se encuentren.

Los polímeros presentan transiciones de fase dependientes de la temperatura. Estas transiciones implican cambios en su solubilidad o en la fluidez de sus cadenas y son delimitadas por la temperatura de solubilidad crítica baja o alta (LCST y UCST, por sus siglas en inglés; por *Lower Critical Solution Temperature* y *Upper Critical Solution Temperature*, respectivamente)⁷⁸ y la temperatura de transición vítrea (T_g ; por el inglés *Glass Transition Temperature*)⁷⁹. La LCST y UCST son resultado de las alteraciones en la interacción entre los polímeros y el disolvente. En este sentido, las cadenas poliméricas que se vuelven insolubles al calentarse presentan una LCST; mientras que, las que son solubles al aumentar la temperatura tienen una UCST. Esto también puede definirse en función a las fases que presenta el sistema. En la Figura 18, se aprecian las curvas binodales generadas a partir de graficar la temperatura del medio contra una magnitud que evidencie la composición del sistema, como lo es su fracción de volumen (Φ). Estas curvas delimitan la existencia de sistemas de una y dos fases. Las zonas abarcadas por

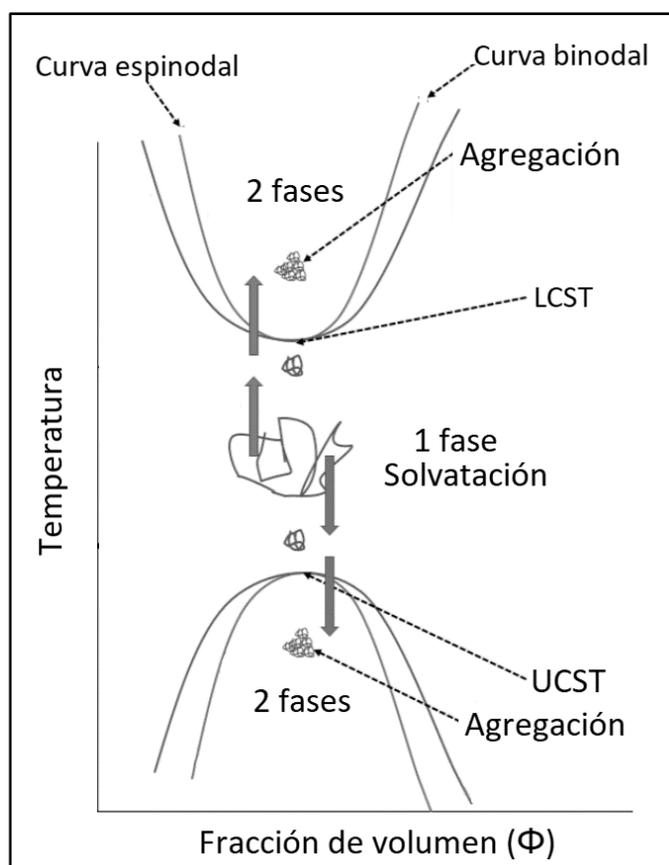
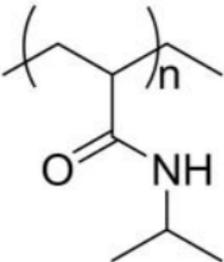
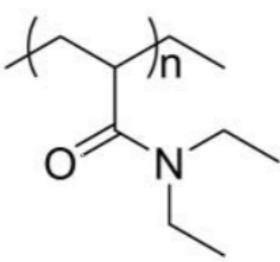
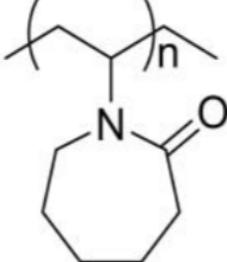
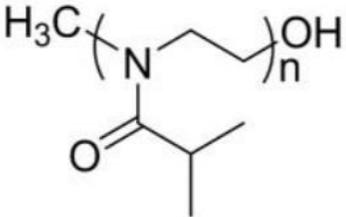
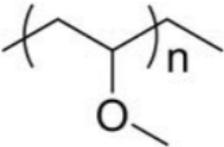
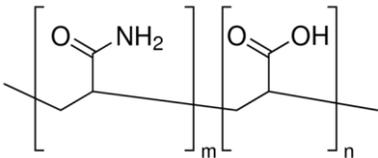


Figura 18. Curva binodal y espinodal de sistemas poliméricos termosenesibles. Se aprecia los puntos críticos mínimo y máximo: LCST y UCST, respectivamente. Además, se observa la agregación y solvatación de las cadenas poliméricas en un sistema de dos fases y una fase, respectivamente

curvas espinodales definen fluctuaciones de estabilidad de fase pequeñas y coinciden con su respectiva curva binodal en un punto crítico que puede ser mínimo o máximo. El punto crítico mínimo de coincidencia es la LCST, mientras que el máximo es la UCST. La T_g, por su parte, delimita estados en la naturaleza de los polímeros; pasando de una forma vítrea, a temperaturas por debajo de ella, debido a las restricciones en la movilidad de las cadenas poliméricas; o una forma gomosa, en temperaturas por arriba de ella, resultado de una amplia movilidad en las cadenas. La T_g no es un valor específico tal cual y varía dependiendo del método que se utilice para determinarla. Es por ello, que en farmacia se prefieren materiales con transiciones de fase debidas a la solubilidad para los sistemas modulados por activación.^{80, 81} Todos los polímeros poseen una LCST y una UCST, sin embargo, el desarrollo de los sistemas farmacéuticos termosensibles requiere de materiales con temperaturas de transición cercanas a la corporal o a las alcanzadas en condiciones patológicas.⁷⁸ En la Tabla 3 se muestran las estructuras con los polímeros que pueden ser utilizados para estos fines y sus temperaturas de transición de fase. Como se aprecia, los polímeros LCST (T3a, T3b, T3c, T3d y T3e) son mayoritarios, mientras que el comportamiento UCST (T3f) es más difícil de observar, debido a que la UCST suele estar por debajo de la T_g.⁷⁹ En este punto, se dificulta la separación de fase por el poco movimiento en las cadenas poliméricas.

Tabla 3. Estructuras de polímeros termosensibles con LCST y sus temperaturas de transición de fase: a) Poli(N-isopropil-acrilamida) (NIPAM), b) Poli(N,N-dietil-acrilamida) (PDEAAM), c) Poli(vinil-caprolactona) (PVCL), d) Poli(2-isopropil-2-oxazolina) (PIOZ) y e) Poli(vinil-metil-éter) (PVME); así como un polímero termosensible UCST con su temperatura de transición de fase: f) Copolímero de poli(acrilamida) y ácido poli(acrílico) (PAM-co-PAAc)

a) PNIPAM	b) PDEAAM	c) PVCL
		
LCST= 30-34°C	LCST= 32-34°C	LCST= 30-50°C
d) PIOZ	e) PVME	f) PAM-co-PAAc
		
LCST= 48°C	LCST= 37°C	UCST= 25°C

La transición LCST se debe a alteraciones entrópicas que alteran la energía libre de *Gibbs* (ΔG) resultante del sistema. A temperaturas por debajo de la LCST, las cadenas poliméricas del material interactúan con el agua, a través de puentes de hidrógeno. En este sentido, la formación de estos enlaces implica, por un lado, una entalpía (ΔH) negativa; además de un acomodo ordenado en el sistema, lo cual ocasiona una disminución en su entropía (ΔS). La conjugación de ambas contribuciones implica que el valor de ΔG sea negativo y por lo tanto el proceso de solubilización del polímero en agua sea espontáneo, favoreciéndose un sistema de una sola fase.^{80, 82}

Por el contrario, a temperaturas superiores a la LCST, se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas poliméricas del sistema. Como resultado, los puentes de hidrógeno se rompen y el orden del sistema decae. Esto conlleva a que la ΔH sea positiva, además que la ΔS aumente; lo cual hace que la ΔG adquiera un valor positivo, que equivale a una solubilización no espontánea, en donde prevalecen dos fases; el polímero colapsado y el agua.

Este fenómeno, se puede extrapolar para el diseño de nanogeles termosensibles cargados con fármaco. Cuando el nanogel se encuentre por debajo de su LCST, se favorecerá su estado hinchado, de manera que si el fármaco es hidrofílico se alentarán su difusión a través de la estructura; pero si es hidrofóbico, ésta se facilitará. Por el contrario, en un ambiente con temperaturas superiores a la LCST, el nanogel estará colapsado, razón por la cual, si el principio activo es hidrofílico podrá salir rápidamente; pero si es hidrofóbico, ésta se dificultará.^{78, 80}

La LCST es el punto que delimita un cambio en el tamaño del sistema al pasar de hinchado a colapsado o viceversa, por lo que en algunas ocasiones también se conoce como temperatura de transición de fase volumen (VPTT, por sus siglas en inglés, por: *Volume Phase Transition Temperature*).⁸¹

El valor de LCST de un material puede alterarse al incorporar otro tipo de monómeros que afecten el balance hidrofílico e hidrofóbico del sistema. De este modo, un incremento en los grupos hidrofílicos incrementa el valor de la LCST, mientras que un aumento en grupos hidrofóbicos tiene el efecto contrario.⁸⁰ Esta estrategia permite desplazar el valor de la LCST de acuerdo con tipo de sistema farmacéutico a las condiciones fisiológicas o patológicas específicas necesarias.

2.7.2.3 Caracterización de sensibilidad de estímulos en nanogeles

Los sistemas de liberación modulados por activación se someten a una caracterización adicional que permite determinar con exactitud el pH y la temperatura, según sea el caso, a partir del cual se presenta un cambio estructural que de pauta a la liberación o retención del fármaco. Para ello, se aprovechan los cambios físicos medibles que genera el estímulo en el nanogel al encontrarse en un estado hinchado o colapsado.

Para los nanogeles sensibles a pH y a temperatura las técnicas más recurridas son DLS y turbidimetría.⁸² Como se mencionó anteriormente, a través de DLS se conoce el d_H del sistema. De esta manera, se puede medir el tamaño de los nanogeles en diferentes condiciones, ya sea variando el pH, la temperatura o ambos. Dependiendo del sistema, se podrá identificar el pH y temperatura a la cual el nanogel se hincha o colapsa, dado que los sistemas hinchados son más grandes a los colapsados.

En el caso de la turbidimetría, se utiliza la espectrofotometría UV-VIS para identificar el punto nube del nanogel. El punto nube marca la diferencia entre una dispersión transparente, en la que el nanogel se encuentra hinchado y en una fase; de una dispersión turbia, en la que el nanogel está colapsado y en dos fases.⁸³ En el caso de sistemas termosensibles, el punto nube no siempre es equivalente a la LCST, puesto que depende de la concentración de la dispersión del nanogel y no precisamente representa el punto menor en un diagrama de transición de fases, sin embargo, es un parámetro de interés en la caracterización del sistema y brinda una aproximación de dicho valor.⁸⁴

Finalmente, la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés por: *Differential Scanning Calorimetry*) se utiliza únicamente para la caracterización de nanogeles sensibles a la temperatura, puesto que proporciona su LCST o UCST.⁸⁵

A continuación, se revisarán los fundamentos de la turbidimetría con espectrofotometría UV-VIS. No se indagará más en DLS, dado que anteriormente ya se revisaron los fundamentos.

2.7.2.3.1 Turbidimetría

La turbidimetría es el método más ampliamente usado para la determinación del punto nube en la transición de fase de una dispersión polimérica.⁸³ En la Figura 19 se aprecia el mecanismo de esta técnica. Cuando un rayo de luz incide perpendicularmente sobre una dispersión, las partículas contenidas en ella absorberán una parte de la radiación incidente y dejarán pasar el resto (19a). La transmitancia de una partícula en dispersión es la relación entre la cantidad de la luz transmitida una vez que la ha atravesado y la cantidad de luz que incidió sobre ella (19b). De esta manera, la turbidimetría mide la luz transmitida a través de la espectrofotometría UV-VIS.⁸⁶ Para ello, se usan disoluciones de nanogel con pH ajustado mediante disoluciones amortiguadoras y un control de temperatura.

Como su nombre lo indica, la espectrofotometría requiere del uso de un espectrofotómetro. Este aparato mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra y la compara con la intensidad de luz de un blanco.

Las partes básicas de un espectrofotómetro (19c) son: una fuente de luz, que suele ser una lámpara de deuterio; un soporte para la muestra; una rejilla de difracción o monocromador, que separa las diferentes longitudes de onda de la luz y un detector. Las muestras de nanogel se colocan en una celda que por lo general es rectangular y mide 1 cm de ancho.

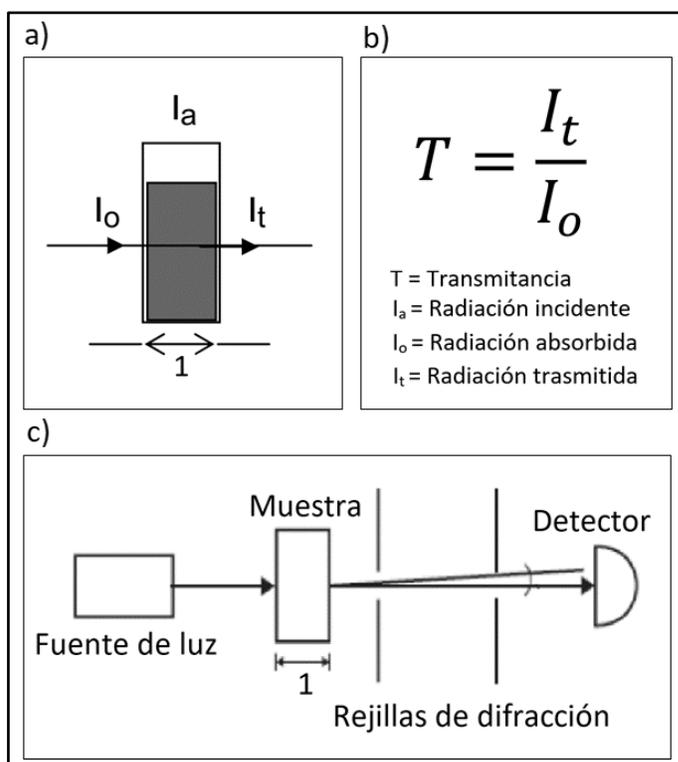


Figura 19. Fundamento de la turbidimetría para la caracterización de nanogel sensibles a un estímulo. En a) se muestra la radiación transmitida y absorbida al pasar a través de una muestra en una celda; en b) se aprecia la ecuación matemática para el cálculo de T; y en c) se encuentran las partes que conforman a un

Las celdas ideales utilizadas son de cuarzo, aunque suelen ser comunes las de vidrio o plástico, sin embargo, estos dos últimos materiales absorben en la región del UV, lo que limita su utilidad.⁸⁷

Cuando el nanogel se encuentra en condiciones ambientales que favorezcan su hinchamiento, el disolvente entrará en la estructura, por lo que se facilitará el paso de la luz incidente a través de él, de modo que la transmitancia será cercana al 100%. Por el contrario, cuando el nanogel esté colapsado, se formarán aglomerados poliméricos que impedirán el total paso de la luz, de manera que la transmitancia disminuirá.^{83, 84}

Como se ha mencionado, el punto nube de un nanogel depende de su concentración, pero por lo general para su determinación se utilizan concentraciones entre 0.1 y 10% en

masa del sistema.⁸⁵ Una vez hecha la medición, se grafican los datos de transmitancia a determinada longitud de onda contra los valores de pH o la temperatura, para construir una curva de sensibilidad ante el estímulo.

El punto de inflexión de la curva es el valor ante el cual el sistema es sensible y equivale a la LCST.⁸³ Cabe señalar que hay sistemas en los que no existe un punto de inflexión definido y el cambio se observa en un intervalo de temperaturas. En estos casos se habla de una transición denominada *like* LCST.⁸⁶

2.7.3 Nanogel como sistemas de liberación vectorizados

A pesar de que los sistemas farmacéuticos modulados por activación controlan la liberación del principio activo en determinadas condiciones fisiológicas, no se tiene un control específico para que éste se libere exclusivamente en una zona patológica, puesto que el ambiente de otras regiones del organismo puede provocar que el fármaco salga del acarreador.

Una manera de hacer más selectiva la liberación del fármaco de estos sistemas en los órganos, tejidos o células enfermas es mediante las técnicas de vectorización que se aprecian en la Figura 20.⁹⁰ A diferencia de las técnicas convencionales (20a) que liberan el principio activo en cualquier zona, las técnicas de vectorización propician la localización del fármaco en el sitio enfermo. De acuerdo con la manera en la que se direcciona al acarreador, los sistemas vectorizados pueden ser pasivos (20b) o activos (20c).⁹¹

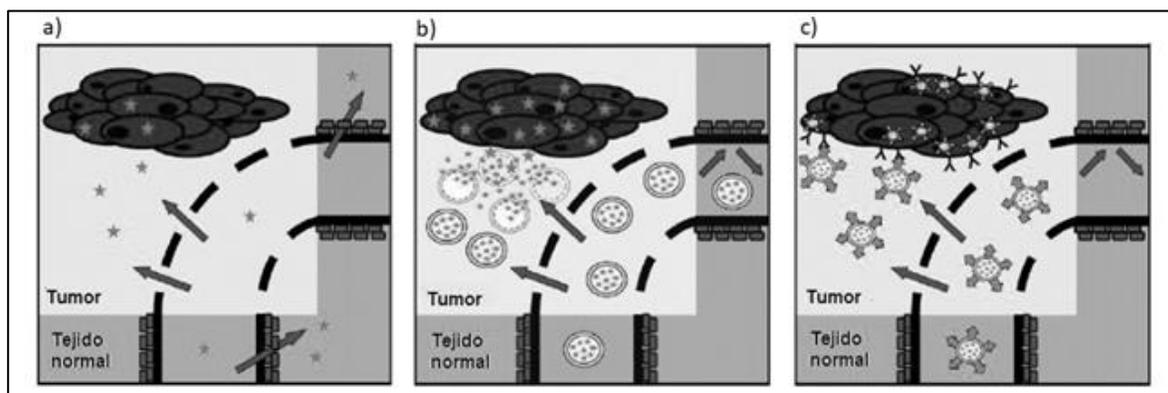


Figura 20. Sistemas farmacéuticos: a) sin vectorización; y con vectorización b) pasiva; y c) activa

Los sistemas de vectorización pasiva aprovechan las características fisiológicas naturales que brinda la enfermedad para facilitar la distribución selectiva del fármaco. Este tipo de vectorización es posible en afecciones en las que existen alteraciones en los vasos sanguíneos o generación de tejido nuevo y desordenado.^{91,92} El ejemplo clásico aplicable es en el cáncer.⁹⁰ Los tumores cancerígenos poseen vasos sanguíneos irregulares, dilatados y defectuosos, puesto que son resultado de un proceso de angiogénesis. Por otro lado, las células endoteliales tumorales están desorganizadas y poseen grandes fenestraciones. Estas anomalías fisiológicas permiten un fenómeno en el que se facilita la permeación de sustancias a través de los tejidos y se conoce como el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, por sus siglas en inglés por; *Enhanced Permeability and Retention*). El efecto EPR favorece la entrada de sistemas nanométricos farmacéuticos en un tejido dañado y dificulta su salida, manteniéndolo en la zona para liberar su contenido. Los tumores son similares a otra estructura denominada *pannus*, que es un tejido de granulación altamente vascularizado, desarrollado en la artritis reumatoide, de modo, que el efecto EPR es también aplicable para esta enfermedad.^{90,92}

La vectorización activa direcciona un acarreador farmacéutico a determinado sitio al incluir un elemento direccionador o ligando que es afín a un receptor localizado en el órgano, tejido o célula de interés.

Otra estrategia es el uso de estímulos externos. El más utilizado es el magnético, con el desarrollo de sistemas con óxidos de Ni, Co y Fe, que son conducidos a la región bajo la influencia de un campo magnético.⁹² Aunque se ha trabajado incansablemente para mejorar

estos sistemas, aún se requiere de la aplicación de campos magnéticos muy fuertes, por lo que el direccionamiento a través de esta técnica sigue siendo inviable.^{90, 91}

2.8 Caracterización de nanogel con fármaco incluido

Los nanogel como acarreadores de fármaco son capaces de liberarlo de manera controlada y localizada en determinadas zonas del organismo y ante condiciones específicas. La inclusión del principio activo en el nanogel se efectúa mediante dos mecanismos: la adsorción y la absorción.⁹⁵

La adsorción es un proceso espontáneo en el que un soluto, denominado adsorbato, se concentra en la superficie de otro material, llamado adsorbente. De acuerdo con el tipo de fuerzas involucradas, la adsorción puede ser: física o fisorción, si prevalecen fuerzas intermoleculares como interacciones electrostáticas entre grupos cargados o iones y fuerzas de *Van der Waals*; o química o quimisorción, cuando existen enlaces covalentes entre el adsorbato y el adsorbente. La energía de adsorción en la fisorción suele ser inferior a la que se aplica en un enlace químico, por lo que son procesos reversibles con baja entalpía de adsorción.

Para la adsorción de moléculas de fármaco en un nanogel, el mecanismo más comúnmente empleado es la fisorción. Esto debido al uso de monómeros con grupos cargados que la facilitan. En caso de nanogel sin carga, se puede funcionalizar su superficie, al incorporar elementos ionizables que la permitan.^{96, 97}

Por otro lado, la absorción es la penetración de un soluto dentro de un material. En el caso de los nanogel, la absorción de principios activos es posible debido a su capacidad de hinchamiento. Los nanogel hinchados presentan canales debido a los entrecruzamientos entre las cadenas poliméricas que los conforman. De este modo, el agua con fármacos u otras sustancias disueltas puede ingresar dentro de la matriz del nanogel a través de difusión.⁹⁵

En los sistemas suaves como los nanogel, los mecanismos de adsorción y absorción suceden simultáneamente. De manera que para la inclusión de fármaco en estos sistemas se deben considerar ambos fenómenos. Desafortunadamente, en la práctica resulta complicado separarlos, por lo que no se puede conocer la contribución de cada uno en la carga del sistema, siendo la adsorción el mecanismo que mejor se puede caracterizar.^{96, 97}

Para estudiar a la adsorción se pueden construir isotermas de adsorción que permitan conocer las condiciones ideales para el proceso.⁹⁸ Sin embargo dadas las características del nanogel, estos pasan a ser isotermas de inclusión, de modo que se consideran los procesos de adsorción y absorción en la carga del sistema. Por otro lado, para el estudio de la inclusión, resulta muy práctico la determinación del potencial zeta de los materiales con y sin recubrimiento, así como con y sin principio activo.

2.8.1 Isotermas de inclusión para nanogeles

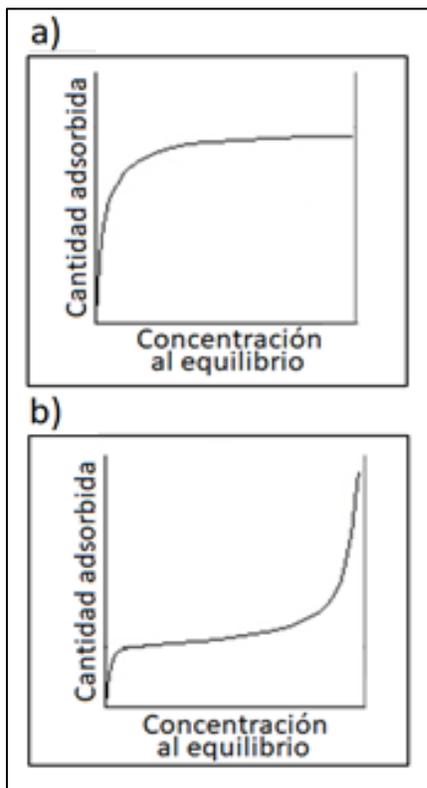


Figura 21. Cantidad adsorbida contra concentración al equilibrio en isotermas: a) Tipo I; y b) Tipo II

La adsorción y absorción de un soluto en un sistema va acompañada del proceso inverso, que se conoce como desorción.⁹⁹ El equilibrio entre estos fenómenos depende de algunos factores como; la temperatura, el área específica de adsorción, el volumen de absorción, así como de la naturaleza de los adsorbatos (y/o adsorbentes) y adsorbentes (y/o adsorbentes).¹⁰⁰

Una isoterma de inclusión describe el equilibrio de inclusión y desorción de una sustancia en una superficie y volumen a temperatura constante.⁹⁹

A lo largo del tiempo, se han propuesto numerosos modelos matemáticos y teorías que permiten el análisis y la descripción de la adsorción; que en este caso serán utilizados para intentar describir la inclusión. El conocimiento del equilibrio de adsorción para un determinado sistema posibilita la selección de condiciones ideales para el proceso.

Existen 6 tipos de isotermas de adsorción;¹⁰⁰ como los que se muestran en la Figura 21; sin embargo, el entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas de los nanogeles hace que sean sistemas porosos, de manera

que los modelos de adsorción aplicables son los tipos I (21a) y II (21b). En cuanto a los tipos III, IV, V y VI; son sólo utilizados en materiales no porosos.¹⁰¹

En la Tabla 4, se muestran los modelos matemáticos de las teorías que junto con los tipos de isotermas describen la adsorción de adsorbatos en adsorbentes.^{99, 100, 101}

La isoterma de tipo I describe la adsorción en superficies uniformes que son cubiertas por el adsorbato hasta la formación de una monocapa. Por lo general, los procesos de quimisorción se acoplan a esta isoterma. Esta isoterma se ajusta a la teoría descrita por *Langmuir*. La ecuación de *Langmuir* (T4a) representa adecuadamente ciertos casos de quimisorción y ha sido de especial relevancia para el desarrollo de posteriores modelos de fisorción. Este modelo asume que la superficie del adsorbente contiene un número finito de sitios activos homogéneos y energéticamente equivalentes, en donde únicamente puede adsorberse una molécula de soluto, descartando todo tipo de interacciones laterales, es decir, no se pueden depositar moléculas unas sobre otras y tampoco existe relación entre las moléculas adsorbidas vecinas. La localización del proceso conlleva a que la energía de adsorción sea constante y a que el equilibrio se alcance en un punto de saturación. La

linealización de la ecuación de *Langmuir* permite conocer a la constante de equilibrio de Langmuir (K_L), misma que muestra el grado de afinidad entre el adsorbente y el adsorbato.^{99, 100, 101}

Tabla 4. Ecuaciones matemáticas de modelos de isotermas de adsorción

	Modelo	Ecuación	Parámetros
a)	Langmuir	$q_e = \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e}$	q_e = Cantidad adsorbida por peso unitario de adsorbente (mg/g) K_L = Constante de equilibrio de <i>Langmuir</i> (mg/g) C_e = Concentración de soluto al equilibrio (mg/L)
b)	BET	$q_e = \frac{q_s C_{BET} C_e}{(C_s - C_e) \left[1 + (C_{BET} - 1) \left(\frac{C_e}{C_s} \right) \right]}$	q_s = Capacidad de adsorción al equilibrio (mg/g) C_s = Capacidad teórica de saturación (mg/g) C_{BET} = Concentración del adsorbato en la monocapa de saturación (L/mg)
c)	Freundlich	$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{m}}$	m = Constante de isoterma de <i>Freundlich</i> K_F = Constante de <i>Freundlich</i>
d)	Sips	$q_e = \frac{(K_S C_e)^\gamma}{1 + (K_S C_e)^\gamma}$	K_S = Constante de <i>Sips</i> (L/mg) ^{ms} γ = Exponente de <i>Sips</i>
e)	Jovanovic-Freundlich	$q_e = q_J (1 - e^{-q_J C_e})$	q_J = Constante de <i>Jovanovic</i>

Las isotermas de tipo II representan adsorciones con adsorbentes no porosos o macroporosos. En este caso, el adsorbato cubre al adsorbente hasta la formación de una monocapa, pero el proceso continúa posibilitando las multicapas. Las adsorciones físicas con interacciones poco específicas se acoplan a este tipo de isoterma. La ecuación BET (siglas en honor a sus desarrolladores: *Brunauer, Emmett y Teller*) (T4b) es una extensión de la teoría de *Langmuir* que se ajusta para las isotermas de tipo II. Esta teoría considera que las moléculas adsorbidas en la primera capa actúan como sitios de adsorción para las moléculas de las capas posteriores.^{98, 99, 101}

Por otro lado, existen una serie de ecuaciones empíricas para el ajuste de datos de adsorción. La más empleada sigue el modelo de *Freundlich* (T4c), que describe adsorciones en superficies heterogéneas, las cuales contienen diferentes sitios de adsorción para las moléculas. *Freundlich* considera comportamientos no lineales entre la cantidad adsorbida y la no adsorbida. Una limitación en este modelo es que no establece un valor límite de la cantidad adsorbida, además que no reproduce correctamente los datos para bajas temperaturas.

Para aumentar el grado de ajuste de los datos experimentales y considerar superficies heterogéneas, que presentan un valor límite de la cantidad adsorbida, se propusieron dos modelos híbridos; la isoterma de *Sips* o modelo de *Freundlich* generalizado y el modelo de *Jovanovic-Freundlich*. La isoterma de *Sips* (T4d) propone una ecuación similar en forma al modelo de *Freundlich*, pero siguiendo los fundamentos tal como los plantea *Langmuir*.¹⁰⁰ En el caso del modelo de *Jovanovic-Freundlich* (T4e) también se sigue lo estipulado por *Langmuir*, pero además se considera un posible contacto mecánico entre las moléculas del adsorbente y del adsorbato.¹⁰¹

2.8.2 Potencial zeta en nanogel recubiertos

La repulsión entre las partículas de nanogel, debido a las atracciones electrostáticas impartidas por sus grupos cargados o por las sustancias adsorbidas en él, influye en su estabilidad. Resulta importante caracterizar la estabilidad de los sistemas, dado que cuando la carga de los nanogel es elevada, se favorece su dispersión en el medio, pero conforme ésta se reduce, las partículas de nanogel se aglomeran pudiendo llegar a sedimentar. Esto de acuerdo con la teoría DLVO (siglas en honor a sus desarrolladores: *Derjaguin, Landau, Verwy* y *Overbeek*).¹⁰²

El modelo de la doble capa permite estudiar el ambiente iónico de los coloides, como se observa en la Figura 22. Esta teoría se basa en la formación de capas, debido a las atracciones iónicas entre las partículas coloidales y los iones del medio, partiendo del hecho que los coloides poseen cierta carga de acuerdo con la naturaleza de los materiales que los componen. Por una parte, el efecto contra-ion provoca que los iones de carga opuesta presentes en el medio se atraigan hacia la superficie del coloide, formando una capa rígida denominada capa de *Stern*. Los iones de carga opuesta restantes que no forman parte de la capa de *Stern*, se mantienen cercanos a la partícula coloidal, formando la llamada capa difusa. Además de estos iones de carga opuesta, la capa difusa también se compone de iones con carga igual a la del coloide, que se conocen como co-iones. Mientras que la concentración de los contra-iones disminuye cuando se alejan de la partícula coloidal, la concentración de los co-iones se incrementa. De esta manera, la densidad de carga es alta, en zonas cercanas al coloide, pero tiende a cero, conforme las concentraciones de ambos tipos de iones se asemejan.^{48, 102}

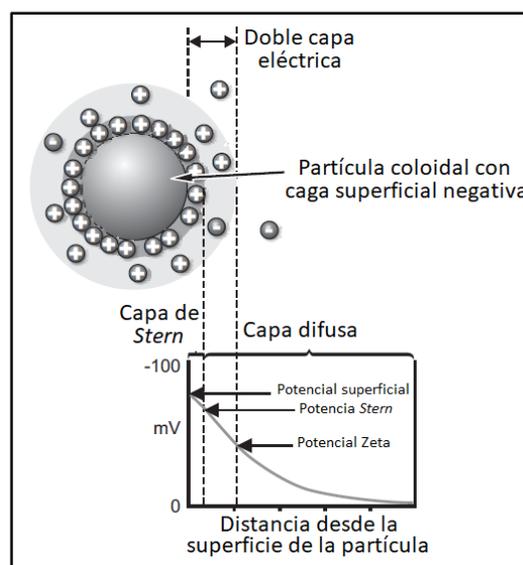


Figura 22. Teoría de la doble capa en un coloide con carga negativa.

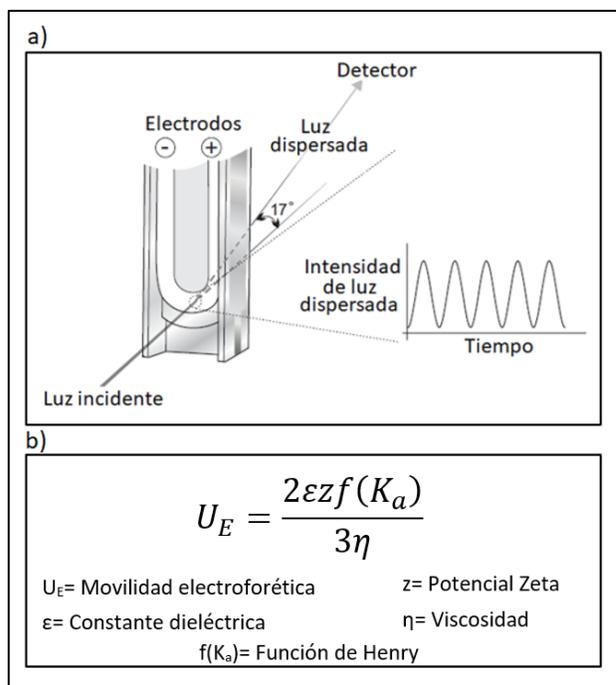


Figura 23. a) Funcionamiento de DLS y LDV para determinar el potencial zeta; y b) Ecuación de Henry

El potencial zeta es el potencial electrostático en la zona entre la capa de Stern y la capa difusa.¹⁰² Su importancia radica en que permite controlar el comportamiento de un coloide al indicar los cambios en el potencial de su superficie y las fuerzas de repulsión existentes. La medición del potencial zeta se obtiene con DLS, mediante el uso de electroforesis láser de Doppler y aplicando la velocimetría de laser Doppler (LDV; por sus siglas en inglés por Laser Doppler Velocimetry), cuyo mecanismo se muestra en la Figura 23. Estas técnicas miden la rapidez de movimiento de una partícula en dispersión cuando se aplica un campo eléctrico usando electrodos que se acoplan a una celda en la que se coloca la muestra. El movimiento en las partículas

ocasiona una fluctuación en la señal de un rayo láser que se hace pasar a través de la muestra. Posteriormente, un procesador extrae las frecuencias características de la luz dispersada y la compara con otras ya conocidas para la obtención de la movilidad electroforética (U_E) (23a). Finalmente, a través de la ecuación de Henry (23b), se correlacionan la U_E con la viscosidad (η) y la constante dieléctrica del medio (ε) para así obtener el potencial zeta (z).⁴⁸

2.9 Liberación de fármaco de nanogeles

El desarrollo de nuevos sistemas farmacéuticos requiere del estudio de la liberación y la disolución de los principios activos que contienen. El entendimiento de estos procesos permite optimizar su diseño, pues busca predecir su comportamiento *in vivo*, a través de experimentos *in vitro*. Este análisis posibilita conocer el mecanismo por el cual se lleva a cabo la liberación del fármaco del acarreador. Para ello se efectúan cinéticas de liberación que indican la cantidad de fármaco que sale del sistema con respecto al tiempo, de acuerdo con el ajuste a modelos matemáticos, que están basados en las características físicas del sistema. Las ecuaciones matemáticas y gráficos que contemplan estos modelos se muestran en la Tabla 5.^{103, 104, 105}

La selección del modelo que describe el comportamiento del sistema farmacéutico requiere de criterios estadísticos, que aceptan aquél en el que; el coeficiente de correlación (R^2) sea

Capítulo 2. Antecedentes

más cercano a 1; el valor en el criterio de selección de modelo (MSC) sea mayor; el valor de la suma de cuadrados (SSR) sea menor; así como el de menor criterio de *Akaike* (AIC).¹⁰⁶

Tabla 5. Ecuaciones matemáticas y parámetros de los modelos de liberación de fármaco

	Modelo	Ecuación	Parámetros
a)	Orden cero	$W_0 - W_t = kt$ $f_t = k_0t$	W_0 = Cantidad de fármaco inicial en el sistema W_t = Cantidad de fármaco en el sistema a tiempo t k = Constante de proporcionalidad f_t = Fracción de fármaco disuelto en tiempo t k_0 = Constante de orden cero
b)	Primer orden	$\frac{dW}{dt} = k_s(C_s - C)$	$\frac{dW}{dt}$ = Cambio en la tasa de disolución a tiempo t k_s = Constante de primer orden C_s = Cantidad de fármaco inicial en el sistema C = Cantidad de fármaco en el sistema a tiempo t
c)	Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H\sqrt{t}$	M_t = Cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t M_∞ = Cantidad total de fármaco disuelto $\frac{M_t}{M_\infty}$ = Fracción de fármaco disuelto k_H = Constante de disolución de <i>Higuchi</i>
d)	Ritger - Korsmeyer - Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n$	M_t = Cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t M_∞ = Cantidad total de fármaco disuelto $\frac{M_t}{M_\infty}$ = Fracción de fármaco liberado a = Constante geométrica n = Exponente de liberación
e)	Peppas- Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1t^n + k_2t^m$	M_t = Cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t M_∞ = Cantidad total de fármaco disuelto $\frac{M_t}{M_\infty}$ = Fracción de fármaco liberado k_1 = Coeficiente de difusión k_2 = Coeficiente de relajación m = Exponente de liberación

La disolución de fármacos contenidos en formas farmacéuticas que no se desintegran y se liberan lentamente de él, puede ser predicho por el modelo cinético de orden cero (T5a). De este modo, se asume que la superficie del sistema permanece constante y que la liberación del fármaco se da únicamente en función del tiempo, independientemente de su concentración. Este modelo es común para sistemas transdérmicos de tipo reservorio, matrices con fármacos de baja solubilidad, así como formas farmacéuticas recubiertas y sistemas osmóticos.^{103, 104, 105}

Las liberaciones de fármaco que se acoplan al modelo cinético de primer orden (T5b) implican una liberación que depende de la concentración del principio activo y del área

superficial de liberación, de acuerdo con lo estipulado por *Noyes y Whitney*; y que posteriormente fue modificado por *Hixson y Crowell*. Esta teoría suele ser aplicable para sistemas matriciales porosos con fármacos solubles en agua.^{103, 104, 105}

Para describir la cinética de liberación de fármacos contenidos en matrices sólidas o semisólidas se aplica el modelo de *Higuchi* (T5c), el cual se basa en la ley de *Fick* y muestra una dependencia proporcional de la liberación con la raíz cuadrada del tiempo. Este modelo contempla que la concentración de principio activo inicial es mayor a su solubilidad; que su difusión sucede en una sola dirección de manera constante; y que el hinchamiento de la matriz y su disolución son despreciables. *Higuchi* es aplicable para matrices con fármacos solubles en agua.^{103, 104, 105}

El modelo de *Ritger y Peppas*; y *Korsmeyer y Peppas* (T5d); conocido como ley de poder, establece una ecuación semi-empírica para describir la liberación de fármaco de sistemas poliméricos, particularmente hidrogeles; a través de una relación exponencial entre la liberación y el tiempo, tomando en cuenta la influencia de las características geométricas del sistema.

La ventaja de la ley de poder es que permite modelar la liberación sin necesidad de conocer el mecanismo que la posibilita. Posteriormente, de acuerdo con el valor obtenido en el exponente n , se asigna el tipo de liberación, pudiendo ser: de tipo difusional o *Fickiana*, contemplada en el caso 1 ($n=0.5$) (T6a); no difusional o no *Fickiana*, según el caso II ($n=1$) (T6b); o un transporte anómalo gobernado por difusión e hinchamiento, de acuerdo con el caso 3 ($0.5 < n < 1$) (T6c). En la Tabla 6 se aprecia la geometría del sistema esperada, su mecanismo de liberación y el valor de n .^{103, 104, 105}

Tabla 6. Mecanismo de liberación y geometría del sistema de acuerdo con n para el modelo *Ritger-Korsmeyer-Peppas*

	Mecanismo de liberación	Geometría	Valor de n (o m)
a)	Difusión <i>Fickiana</i>	Planar Cilindro Esfera	0.50 0.45 0.43
b)	Difusión no <i>Fickiana</i>	Planar Cilindro Esfera	1.0 0.89 0.85
c)	Transporte anómalo	Planar Cilindro Esfera	$0.50 < n < 1.0$ $0.45 < n > 0.89$ $0.43 < n > 0.85$

El modelo de *Peppas y Sahlin* (T6e) considera que la liberación en sistemas poliméricos está mediada por el hinchamiento del material debido a su interacción con el medio, así como a la relajación de las cadenas que lo conforman, lo que favorece la movilidad del principio

activo. La ecuación matemática del modelo considera un coeficiente m que relaciona el mecanismo de liberación de acuerdo con su geometría y los valores coinciden con los establecidos por el modelo *Ritger-Korsmeyer-Peppas*.^{103, 104, 105}

2.10 Nanogeles en el tratamiento de la artritis reumatoide

A lo largo del tiempo, el uso de nanoacarreadores farmacéuticos ha sido ampliamente investigado para mejorar el tratamiento de diversas enfermedades. En este sentido, ha destacado el diseño de sistemas para el cáncer, debido a la alta morbilidad y mortalidad que se le asocia. A pesar de esto, en los últimos años, se ha incrementado el interés en el desarrollo de vehículos para el tratamiento de la artritis reumatoide. Esto porque la artritis reumatoide comparte ciertas similitudes patológicas con el cáncer. En primera instancia, la generación de estructuras granulomatosas en los vasos sanguíneos, que propician a la formación del *pannus* en la artritis reumatoide, es análogo a los tumores cancerígenos. Por otro lado, las condiciones ambientales presentadas en las articulaciones inflamadas, que implican un aumento en la temperatura y una disminución en el pH en las zonas afectadas, coinciden con las condiciones cancerosas. Finalmente, la sobreexpresión de algunos receptores biológicos en común; como el receptor folato, el CD44, la integrina $\alpha_v\beta_3$, la E-Selectina y el ICAM-1, son activados durante el desarrollo de ambas enfermedades. De este modo, una gran cantidad de acarreadores que funcionan para cáncer, podrían utilizarse en la artritis reumatoide.

En la actualidad existen numerosas investigaciones que emplean liposomas, nanopartículas metálicas (de Fe y de Au) y dendrímeros, como acarreadores de fármacos para artritis reumatoide, sin embargo, ninguna de estas propuestas ha llegado a ser comercializada, porque se utilizan materiales no biocompatibles y no biodegradables, además que su generación implica procesos de fabricación no escalables para la industria. El uso de nanogeles elimina estos inconvenientes ya que su generación requiere de polímeros biocompatibles y su síntesis contempla métodos sencillos y baratos.^{107, 108}

La investigación que se ha enfocado al desarrollo de nanogeles para el tratamiento de la artritis reumatoide ha generado una gran cantidad de sistemas. La gran mayoría busca el diseño de sistemas activados por un estímulo de pH, por lo que destaca el uso del quitosán y del HA.¹⁰⁹ En cuanto a los sistemas termosensibles, hay varios artículos que reportan el uso de NIPAM en combinación con otros monómeros para obtener nanogeles con temperaturas de transición adecuada, pero no buscan tratar la artritis reumatoide, sino otras enfermedades.¹¹⁰ La copolimerización de la NIPAM con monómeros de imidazol ha sido particularmente investigada, dado que este compuesto aromático nitrogenado es capaz de coordinarse con el Cu^+ , lo que ha sido de gran interés en catálisis. Es por ello, que mucha de la bibliografía existente refiere a la obtención de hidrogeles y nanogeles con esta combinación de monómeros.¹¹¹ A pesar de esto, son pocas las referencias que investigan el efecto de monómeros con imidazol en la LCST de polímeros basados en NIPAM y son aún

más pocos los que los utilizan para aplicaciones farmacéuticas y menos aún para la artritis reumatoide.

2.10.1 Nanogeles vectorizados para el tratamiento de la artritis reumatoide

La vectorización activa es la estrategia de mayor uso para el direccionamiento específico de nanogeles a los sitios inflamados por la artritis reumatoide.

El desarrollo de la artritis reumatoide implica la activación de procesos angiogénicos que dan como resultado la formación del *pannus*.¹⁵⁹ Los fibroblastos y macrófagos sinoviales son las células primarias que componen a este tejido, expresando selectivamente receptores superficiales como el folato- β (FR β), el CD44 y la integrina $\alpha\beta$ 3. Por otro lado, las células angiogénicas del tejido vascular activan moléculas de adhesión como la E-selectina y el ICAM-1.¹⁶⁰

El receptor FR β ha resultado atractivo en la investigación, debido su afinidad con el ácido fólico, sin embargo, presenta múltiples isoformas que son igualmente expresadas en otros órganos como la placenta y el riñón, lo que disminuye la direccionalidad del sistema.¹⁶¹ La integrina $\alpha\beta$ 3 solamente se expresa en las células endoteliales inflamadas, pero presenta una baja selectividad porque se une a la secuencia de tripéptidos Arg-Gli-Asp, que está presente en varias proteínas fisiológicas como los fibrinógenos, fibronectinas, osteopontinas, trombospondinas y vitronectinas.¹⁶² La E-Selectina y el ICAM-1 son únicamente expresadas en los vasos sanguíneos que conforman al *pannus*, pero no existen moléculas afines, de modo que para direccionar un sistema farmacéutico sería necesaria la inclusión de anticuerpos, lo cual puede elevar significativamente el costo del tratamiento.¹⁶³ El receptor CD44 es el más indicado para direccionar nanogeles, dado que su sobre-expresión está involucrada únicamente en la activación de linfocitos antígenicos, así como en las células tumorales. Además, que es muy afín a moléculas de HA de alto peso molecular.¹⁶⁴

El HA puede ser entrecruzado con otros monómeros, por lo que es el ligando más empleado en el desarrollo de nanogeles. Algunas investigaciones buscan unir el HA con algunos fármacos, como el MTX.¹¹² Esto porque el HA es tan grande que puede fungir como el vehículo que contiene y direcciona al fármaco. Por otro lado, el HA podría fungir como un recubrimiento, sin embargo el uso de HA como cubierta de nanogeles, únicamente se ha encontrado para aplicaciones microbiológicas, pero no para la construcción de sistemas farmacéuticos.

2.10 Nanogeles con MTX para el tratamiento de la artritis reumatoide

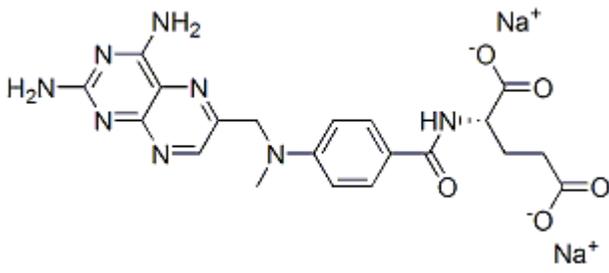
El fármaco de primera elección para el tratamiento de artritis reumatoide es el MTX; un derivado de la aminopterina, que originalmente surgió como antineoplásico, pero que por

Capítulo 2. Antecedentes

más de 50 años ha sido utilizado para este fin.¹⁷¹ El MTX tiene actividad antiinflamatoria, porque inhibe a la tetrahidrofolato reductasa, una enzima involucrada en la síntesis de purinas y piridinas, lo que provoca un aumento en la adenosina que disminuye la acumulación de leucocitos, neutrófilos, macrófagos, células T y otras células inflamatorias, cuya proliferación propicia el desarrollo de esta enfermedad.¹⁷²

El uso del MTX como terapia para la artritis reumatoide ha sido controversial, porque a pesar de su alta tendencia en el desencadenamiento de efectos adversos, ha demostrado ser benéfico para la mayoría de los pacientes, trayendo respuestas positivas entre el 60 y 70% de los casos.¹⁷³ Desafortunadamente, los efectos adversos que desencadena, complican los tratamientos y pueden poner en riesgo a los pacientes. Las terapias a largo plazo se asocian con el desarrollo de daños serios al hígado; generando fibrosis hepática y cirrosis, además de alteraciones en el sistema digestivo y en los riñones.¹⁷⁴ Estos problemas elevan la necesidad de poseer vehículos que lleven este tipo de fármacos exclusivamente a los sitios enfermos.

Tabla 7. Características fisicoquímicas del MTX sódico

Fórmula molecular	
Fórmula estructural	C ₂₀ H ₂₀ N ₈ Na ₂ O ₅
Peso molecular	498.41 g/mol
Color	De amarillo a naranja-marrón
Olor	Sin olor
Cristalinidad	Polvo cristalino
Punto de fusión	823°C
pKa	3.25
Solubilidad en agua	2600 mg/L
Solubilidad	Insoluble en alcohol, cloroformo, éter; ligeramente soluble en HCl diluido; soluble en disoluciones diluidas de hidróxidos y carbonatos.
Log P	-1.85

En la Tabla 7, se muestran las características fisicoquímicas del MTX sódico, la forma más utilizada de este principio activo en tecnología farmacéutica, pues presenta una mejor

solubilidad en agua. De esta información se observa que este fármaco pertenece a la clase 3 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés por; *Biopharmaceutics Classification System*).

El encapsulamiento de fármacos en un nanogel puede llevarse a cabo de varias maneras. Una posibilidad, es la formación de nanogel en una disolución del principio activo, de modo que, al polimerizar, éste quede incluido dentro de la estructura. Una desventaja de este procedimiento, es la posible pérdida de altas cantidades de principio activo durante su caracterización o funcionalización. Otra vía, es mediante el uso de fragmentos que puedan enlazarse al fármaco. En este caso, el riesgo es poseer reacciones de bajo rendimiento que disminuyan la cantidad de fármaco encapsulado. Por esta razón la adsorción de varias moléculas de fármaco sobre la gran área superficial de un sistema nanométrico, resulta lo más viable.¹⁷⁵ En este sentido, las características fisicoquímicas del MTX sódico permiten su adsorción en estructuras hidrofílicas, como el nanogel. En este sentido, la literatura indica que este principio activo, es capaz de formar hasta 18 puentes de hidrógeno; fungiendo como aceptor en 13 posiciones, así como donador en 5 de ellas.¹⁷⁷

El desarrollo de nanogeles sensibles al pH y la temperatura no es un tema nuevo, sin embargo, dado que su uso no ha sido conceptualizado para el tratamiento de la artritis reumatoide resulta novedosa la generación de un sistema farmacéutico simple que sea capaz de mejorar la biodistribución del MTX, de manera que se eficienten los tratamientos y se reduzcan los efectos adversos, a fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Capítulo 3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Elaborar nanogeles vectorizados y sensibles a estímulos de pH y temperatura para la liberación específica de metotrexato en medios que simulen las condiciones de los tejidos artríticos.

3.2 Objetivos particulares

Desarrollar nanogeles con diferentes proporciones de N-isopropilacrilamida, 1-vinilimidazol y N,N'-metileno-bisacrilamida, seleccionando las mejores condiciones de síntesis que favorezcan las reacciones de polimerización radicalaria que los forman.

Caracterizar la composición de los nanogeles mediante espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear; así como estudiar su estructura y morfología con técnicas de microscopía.

Calcular el peso molecular aparente de los nanogeles, usando técnicas de dispersión dinámica y estática de la luz.

Caracterizar la sensibilidad a temperatura de los nanogeles, a través de turbidimetría con espectrofotometría UV-VIS.

Caracterizar la sensibilidad a pH de los nanogeles, usando turbidimetría con espectrofotometría UV-VIS y potenciometría.

Estudiar el tamaño, distribución de tamaño y potencial zeta de los nanogeles; en función al pH y a la temperatura, usando técnicas de dispersión dinámica de la luz.

Estudiar las propiedades reológicas de los nanogeles a diferentes temperaturas; a través de la viscosidad, el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida.

Recubrir los nanogeles con ácido hialurónico para obtener un sistema vectorizado.

Cuantificar la cantidad de ácido hialurónico adsorbida, mediante mediciones de densidad y peso molecular aparente.

Caracterizar los sistemas de nanogel recubiertos con resonancia magnética nuclear, técnicas de microscopía, dispersión dinámica de la luz y potencial zeta.

Utilizar metotrexato como fármaco modelo e incluirlo en los nanogeles recubiertos.

Realizar isotermas de inclusión en los nanogeles recubiertos e interpretar el mecanismo con el que esto sucede.

Realizar estudios de liberación *in vitro* del metotrexato en los sistemas generados a diferentes condiciones e interpretar el mecanismo con el que se lleva a cabo.

Capítulo 4. Hipótesis

Si se polimerizan las cantidades adecuadas de un monómero hidrofílico ionizable con un monómero termosensible y un entrecruzador; se podrán obtener partículas de nanogel sensibles al pH y a la temperatura, capaces controlar la liberación de metotrexato en tejidos artríticos inflamados.

Capítulo 5. Metodología experimental

5.1 Materiales

La N-isopropilacrilamida (pureza $\geq 99\%$), el 1-vinilimidazol, la N, N'-metilenbisacrilamida (pureza $\geq 99\%$), el persulfato de amonio, la N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (pureza $\geq 99\%$) y el ácido hialurónico sódico de *Streptococcus equi*, fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich*; el fosfato de potasio monobásico trihidratado, el fosfato de potasio dibásico monohidratado, el ácido cítrico y el citrato de sodio son de *J.T Baker*; el hidróxido de sodio (pureza $\geq 95\%$) y el ácido clorhídrico (pureza $\geq 95\%$) son de Distribuidora Química ALVI; el metotrexato sódico USP fue donado por Laboratorios *Pisa* y el agua desionizada fue obtenida de un equipo *Nanopure Diamond Barnstead*.

5.2 Síntesis de nanogeles

Se elaboraron nanogeles de N-isopropilacrilamida (NIPAM) y 1-vinilimidazol (1VI) a través del método de polimerización por radicales libres. Se usó persulfato de amonio (APS) como activador y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) como catalizador, además de N, N'-metilenbisacrilamida (MBA) como agente entrecruzador.

Para la síntesis de los nanogeles, se pesaron diversas cantidades de NIPAM, 1VI y MBA, tal como se aprecia en la Tabla 8.

Tabla 8. Formulaciones de nanogeles sintetizados

Formulación	Masa (mg)		
	NIPAM	1VI	MBA
NV5 2E	154	7.7	3.1
NV5 5E	154	7.7	7.7
NV5 10E	154	7.7	15.4
NV7.5 2E	154	11.6	3.1
NV7.5 5E	154	11.6	7.7
NV7.5 10E	154	11.6	15.4
NV10 2E	154	15.4	3.1
NV10 5E	154	15.4	7.7
NV15 2E	154	23.1	3.1
NV15 5E	154	23.1	7.7

Estas sustancias se disolvieron en 20 mL de agua desionizada y se fijó el pH a 6.8 con unas gotas de una disolución de HCl 0.01 M. Posteriormente, el sistema se purgó con N₂ durante 1 min para desplazar el O₂ del medio. Después, se inyectaron 500 μ L de una disolución de 0.357 mM de APS y 500 μ L de una disolución de 0.0089 mM de TEMED. Se sometió el

sistema a una agitación de 350 rpm durante 5 min. Finalmente, se dejó polimerizar a 30°C, con una agitación de 200 rpm, durante 18 horas.

La purificación de los nanogeles se hizo utilizando membranas de diálisis de 12 a 14 KDa, las cuales se sumergieron en agua destilada, manteniendo una agitación de 300 rpm durante 48 horas y cambiando el medio cada 12 horas.

5.2.1 Liofilización de nanogeles

Algunas determinaciones requirieron del uso de muestra liofilizada. Para liofilizar las muestras en cuestión, éstas fueron previamente congeladas a 0°C durante 3 horas. Posteriormente, se liofilizaron, usando una temperatura de -45°C y una presión de vacío de 0.024 mbar, durante 48 horas. Finalmente se usó una temperatura de 25°C durante 3 horas.

5.3 Caracterización de nanogeles

5.3.1 Determinación de la LCST del nanogel mediante turbidimetría

Se determinó el valor de la LCST del sistema midiendo la transmitancia de éste, a través de un espectrofotómetro *Ocean Optics* con una fuente *DT-Mini-2-GS* adaptado a un controlador de temperatura *Quantum North West TC125*, a través de una celda de cuarzo. Para ello, se emplearon 1 mL de la disolución concentrada de nanogel y se diluyó con 2 mL de disolución amortiguadora.

Las condiciones empleadas en estas determinaciones fueron: pH 7 y 5; así como temperaturas de 25 a 50°C, pasando de grado en grado. Para las mediciones de pH 7, se preparó una disolución amortiguadora de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M, mientras que para el pH de 5, se utilizó una disolución amortiguadora de citratos ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.1 M.

Para la medición de temperaturas se esperó un tiempo de estabilización de 1 min después de alcanzar la temperatura en cuestión. Para todas las determinaciones se tomó en cuenta una longitud de onda de 500 nm.

5.3.2 Obtención del tamaño de partícula del nanogel a través de DLS

Se midió el tamaño de partícula de los nanogeles utilizando DLS, mediante un equipo *Zetasizer Nano S*. Para esto, se prepararon diluciones de los nanogeles, tomando 25 μL del concentrado y diluyéndolo con 3.9 mL de disolución amortiguadora. Posteriormente, las muestras se sonicaron durante 1 min con un equipo *Ultrasonik Ney*.

Se utilizaron las mismas soluciones amortiguadoras descritas en el punto anterior para realizar mediciones a pH 5 y 7. Se hicieron determinaciones a 25, 30, 35, 40, 45 y 50 °C, utilizando una celda de vidrio. Se esperó 1 min como tiempo de estabilización al alcanzar la temperatura correspondiente.

5.3.3 Estudio de la estructura química del nanogel mediante espectroscopía FTIR

Para el estudio de la estructura química del nanogel, se realizó un análisis de IR, utilizando un espectrofotómetro de *FTIR/FIR Spectrum 400* de *Perkin-Elmer* de 4000 a 500 cm^{-1} . Para ello se usaron 1 mg de nanogel liofilizado, así como de cada una de las materias primas.

5.3.4 Estudio de la estructura química del nanogel mediante espectroscopía NMR

Para el estudio de la estructura química del nanogel, se realizó un análisis de NMR, utilizando un equipo *Bruker Avance III HD* de 500 MHz. Para ello se usaron 50 mg de nanogel liofilizado y de cada una de las materias primas; y se disolvieron en 1 mL de D_2O .

5.3.5 Obtención del peso molecular aparente del nanogel mediante DLS y SLS

Se determinó el peso molecular aparente de las partículas de nanogel fabricadas a partir de DLS y SLS, usando un equipo *Zetasizer Nano S*. Para ello, se construyó una curva de *Debye*, mediante la preparación de disoluciones de nanogel liofilizado con agua desionizada de concentraciones 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.25, 0.30 y 0.35 mg/mL. Se utilizó agua desionizada como disolvente de referencia que, además, fue filtrada con filtros *Millipore* con tamaño de poro de 0.45 μm .

5.3.6 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel a través de SEM

Se obtuvieron micrografías mediante SEM. Para la preparación de las muestras, se utilizaron 25 μL de nanogel diluido en 3.9 mL de disolución amortiguadora. Posteriormente, estas muestras se colocaron sobre cintas de carbono y se congelaron utilizando N_2 líquido. La descongelación del sistema se llevó a cabo a temperatura ambiente y a una presión de vacío de 98 mmHg, durante 12 horas. Para el estudio, la muestra seca se recubrió con oro y se utilizó un equipo tipo *Jeol 7600*.

5.3.7 Obtención del pK_a del nanogel a través de titulaciones potenciométricas

Se pesaron 50 mg de nanogel liofilizado y se disolvieron con 30 mL de agua desionizada. El pH de la disolución resultante se fijó a 5, mediante una disolución de HCl 0.1 M. Inmediatamente después se procedió a titular la muestra con NaOH 1.5 mM, previamente estandarizada con $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$.

Para otra determinación, se pesaron 50 mg de nanogel liofilizado y se disolvieron en 30 mL de agua destilada. De igual manera, se fijó el pH de la disolución a 5. Se dejó la muestra en

agitación a 350 rpm durante 3 horas. Posteriormente se realizó la titulación de la muestra con NaOH 1.5 mM.

Para ambos casos, los procedimientos se realizaron por triplicado.

5.3.8 Evaluación de la sensibilidad a pH del nanogel por turbidimetría

Se prepararon muestras de nanogel, diluyendo 1 mL del concentrado en 2 mL de disolución amortiguadora de citratos ($C_6H_8O_7/Na_3C_6H_5O_7$) 0.1 M a pH 5, 5.5, 5.8, 6, 6.2 6.5 y 7. Para la determinación se utilizó un espectrofotómetro *Ocean Optics* con una fuente *DT-Mini-2-GS* adaptado a un controlador de temperatura *Quantum North West TC125* y una celda de cuarzo.

Las mediciones se hicieron a temperaturas de 25 a 50°C, pasando de grado en grado y esperando un tiempo de estabilización de 1 min después de alcanzar la temperatura en cuestión. Para todas las determinaciones se tomó en cuenta una longitud de onda de 500 nm.

5.3.9 Estudios de reología en los nanogeles a diferentes temperaturas

Se realizó la caracterización reológica de los sistemas preparados empleando un reómetro de esfuerzos controlados modelo *Discovery HR3* de *TA Instruments* con una geometría de cilindros concéntricos.

Se utilizaron 9 mL de nanogel purificado. Se efectuó una prueba de cizalla simple en un intervalo de flujo de 1 a 100 s^{-1} y una prueba de cizalla oscilatoria con frecuencias angulares de 1 a 100 rad/s. Las pruebas se realizaron por triplicado a 20, 30, 40 y 50°C, utilizando un pH de 7, fijado con solución amortiguadora de fosfatos (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 0.1 M.

5.4 Adsorción de HA en las partículas de nanogel

Para adsorber el HA en las partículas de nanogel. Se prepararon disoluciones de 10 mg de nanogel liofilizado en 20 mL de agua desionizada. Para ello se elaboró una disolución acuosa madre de HA de 0.5 mg/mL. De esta última, se tomaron 100, 250, 400, 500, 1000 y 1500 μL y se añadieron a la disolución del nanogel. Las disolución resultante se agitó a 250 rpm durante 6 horas, controlando la temperatura a 25°C.

Para eliminar el HA no unido, se centrifugó la muestra obtenida a 14,000 rpm durante una hora, utilizando un equipo *Sorvall Primo R*. Se separó el botón y se resuspendió con 10 mL de agua desionizada. Este procedimiento se efectuó 3 veces con cada sobrenadante.

5.4.1 Liofilización de nanogeles recubiertos

Algunas determinaciones requirieron del uso de muestra liofilizada. Para liofilizar las muestras, los botones separados mediante centrifugación fueron recolectados y juntados. Posteriormente, la muestra se congeló a 0°C durante 3 horas. Después, se liofilizaron,

usando una temperatura de -45°C y una presión de vacío de 0.024 mbar, durante 48 horas. Finalmente se usó una temperatura de 25°C durante 3 horas.

5.4.2 Obtención del tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de DLS

Para verificar la adsorción del HA en el nanogel, se midió el tamaño de partícula con DLS, mediante un equipo *Zetasizer Nano S*. Para ello, se prepararon diluciones, tomando 25 μL de nanogel recubierto y diluyendo con 3.9 mL de agua desionizada. La medición se efectuó a 25°C , esperando 1 min para estabilizar la temperatura.

5.4.3 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de SEM

Para verificar el tamaño de partícula y estudiar la morfología del sistema de los nanogeles recubiertos, se obtuvieron micrografías a través SEM. Para la preparación de las muestras, se utilizaron 25 μL de nanogel diluido en 3.9 mL de disolución amortiguadora. Posteriormente, estas muestras se colocaron sobre cintas de carbono. Para secar la muestra se usó una presión de vacío de 200 mmHg, durante 12 horas y temperatura ambiente. Para el estudio, la muestra seca se recubrió con oro y se utilizó un equipo tipo *Jeol 7600*.

5.4.4 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA mediante la obtención de densidades

Para conocer la cantidad de HA unida al nanogel se utilizó una balanza de *Mohr-Westphal*, la cual es capaz de determinar densidades.

Primeramente, se calibró la balanza y se determinaron los parámetros de calibración pertinentes, a través de la medición de la densidad de 20 mL de agua desionizada a 26°C .

Se construyó una curva de calibración a partir de una disolución madre acuosa de HA de 0.5 mg/mL. De esta última se tomaron 12.5, 25, 37.6, 50, 62.5, 75 y 100 μL y se completó un volumen de 25 mL con agua desionizada. Estas disoluciones se agitaron a 250 rpm durante 30 min. Se determinó la densidad de cada una de estas disoluciones para elaborar una curva de calibración.

Por otro lado, de la misma disolución madre, se tomaron 100 μL y se adicionaron a 20 mL de agua desionizada, dejándose agitar a 250 rpm durante 6 horas y controlando la temperatura a 25°C . Se eliminó el HA no unido, centrifugando la muestra a 14,000 rpm durante una hora, utilizando un equipo *Sorvall Primo R*. Se separó el botón y se resuspendió con 10 mL de agua desionizada. Este procedimiento se efectuó 3 veces con el sobrenadante. Se juntó todo el sobrenadante y se le determinó la densidad. Este proceso se hizo por triplicado.

El dato obtenido se interpoló dentro de la curva de calibración para obtener la masa del HA presente en el sobrenadante. Para calcular la masa del HA unido al nanogel, se restó el valor arrojado por la medición del total de HA utilizado inicialmente en el recubrimiento.

5.4.5 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA en cada partícula individual de nanogel mediante el peso molecular aparente por DLS y SLS

Para conocer la cantidad de HA adsorbido por cada partícula individual de nanogel, se determinó su peso molecular aparente con DLS y SLS, usando un equipo *Zetasizer Nano S*. Se realizó una curva de *Debye*, mediante la preparación de disoluciones de nanogel recubierto liofilizado con agua desionizada de concentraciones 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.25, 0.30 y 0.35 mg/mL. Se utilizó agua desionizada como disolvente de referencia que además fue filtrada con filtros *Millipore* con tamaño de poro de 0.45 μm .

El dato obtenido se comparó con el peso molecular aparente del nanogel sin recubrir, la diferencia es el peso molecular aparente del recubrimiento del HA adsorbido.

5.4.6 Determinación de la LCST del nanogel recubierto a diferentes pH mediante turbidimetría

Para comprobar que el recubrimiento de HA no afecta las propiedades de sensibilidad del sistema, se determinó el valor de la LCST, midiendo su transmitancia a través de un espectrofotómetro *Ocean Optics* con una fuente *DT-Mini-2-GS* adaptado a un controlador de temperatura *Quantum North West TC125* y una celda de cuarzo. Para ello, se emplearon 1 mL de la disolución del nanogel recubierto y se diluyó con 2 mL de disolución amortiguadora.

Las condiciones empleadas en estas determinaciones fueron pH 7 y 5, así como temperaturas de 25 a 50°C, pasando de grado en grado. Para las mediciones pH 7 se usó la disolución amortiguadora de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M, mientras que, para el pH de 5, se utilizó la disolución amortiguadora de citratos ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.1 M.

Para la medición de temperaturas se esperó un tiempo de estabilización de 1 min después de alcanzar la temperatura en cuestión. Además, para todas las determinaciones se tomó en cuenta una longitud de onda de 500 nm.

5.4.7 Determinación del tamaño del nanogel recubierto a diferentes pH mediante DLS

Para confirmar la transición de volumen, se determinó el tamaño del nanogel recubierto a pH 7 y 5, utilizando DLS, a través de un equipo *Zetasizer Nano S*. Para ello, se prepararon diluciones de los nanogeles preparados, tomando 25 μL de nanogel y diluyendo con 3.9 mL de disolución amortiguadora. Para las mediciones pH 7 se usó la disolución amortiguadora

de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M, mientras que, para el pH de 5, se utilizó la disolución amortiguadora de citratos ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.1 M.

Se hicieron determinaciones a ambos pH y a las temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 y 50 °C, utilizando una celda de vidrio. Se esperó 1 min como tiempo de estabilización al alcanzar la temperatura correspondiente.

5.4.8 Obtención del pK_a del nanogel recubierto a través de titulaciones potenciométricas

Para verificar que el HA adsorbido no cambia el pK_a del sistema, se pesaron 50 mg de nanogel recubierto liofilizado y se disolvieron con 30 mL de agua destiladas. El pH de la disolución resultante se fijó a 5, mediante una disolución de HCl 0.1 M. Inmediatamente después se procedió a titular la muestra con NaOH 1.5 mM. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Cabe destacar que en este caso no se realizó la titulación después de las 3 horas de contacto del medio ácido con el nanogel, puesto que el objetivo únicamente fue corroborar el pK_a .

5.5 Adsorción de MTX sódico en partículas de nanogel recubiertas

Para realizar las adsorciones de MTX sódico en los nanogeles recubiertos se usó una membrana de diálisis, en donde dentro de ésta se colocó una disolución del sistema y del fármaco, mientras que, fuera de ella sólo se usó una disolución de MTX sódico a la misma concentración. La idea fue que el sistema alcanzara el equilibrio. Cuando el nanogel adsorbiera cierta cantidad de principio activo, una cantidad equivalente de fármaco fuera de la bolsa de diálisis entraría para mantener ambas concentraciones iguales. La Figura 24 esquematiza el sistema montado.

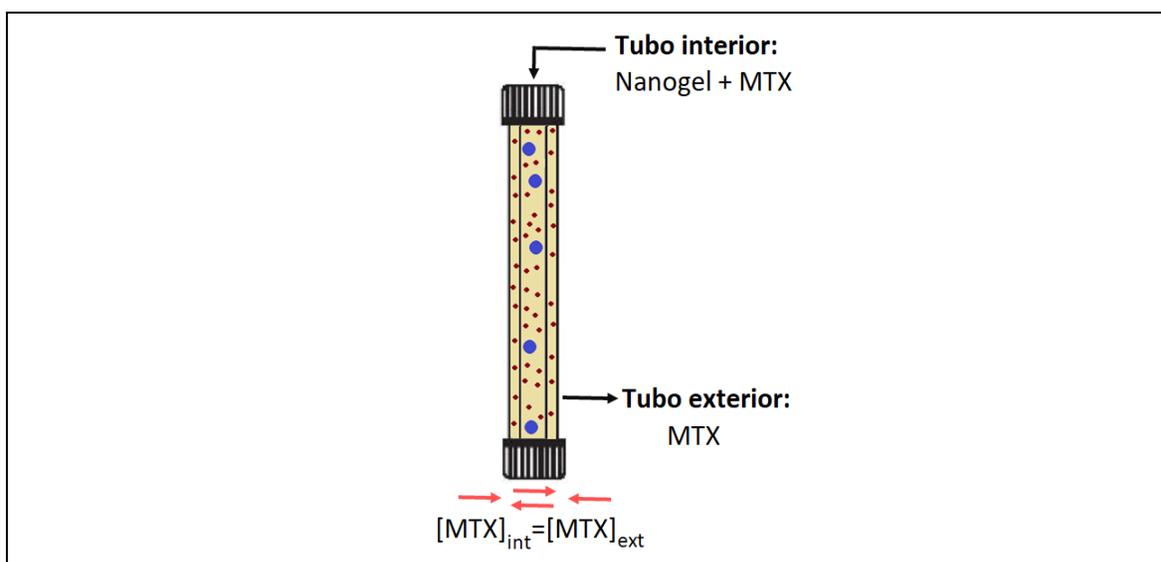


Figura 24. Sistema de tubos empleado para la adsorción de MTX en partículas de nanogel recubierto

5.5.1 Elaboración de isotermas de inclusión del MTX sódico en el nanogel recubierto con HA

Se prepararon disoluciones de MTX sódico de 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.04 y 0.02 mg/ml con agua desionizada. Se utilizaron tubos de diálisis *Float-A-Lyser* con un tamaño de poro entre 12 a 14 KDa. Dentro de cada bolsa de diálisis, se colocaron 10 mg de nanogel recubierto liofilizado, que se dispersó en 5 mL de agua desionizada y 5 mL de la respectiva disolución de MTX sódico. En el tubo externo, se utilizaron 15 mL de agua desionizada y 15 mL de disolución del fármaco. De esta manera, considerando las diluciones, se estudiaron concentraciones de MTX sódico de 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 y 0.01 g/mL. Se dejó el sistema en un baño de agua a 25°C y con una agitación de 250 rpm, durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de 200 µL del tubo externo transcurridos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. Las muestras se diluyeron con 2 mL de desionizada y se leyeron usando un espectrofotómetro *Ocean Optics* con una fuente *DT-Mini-2-GS* y comparando con una curva de calibración del MTX sódico en agua.

Con los datos obtenidos, se construyó la isoterma de inclusión. Los resultados fueron ajustados a los modelos teóricos mediante las aplicaciones de ajuste del *OriginPro 2016*.

5.5.2 Estudio de la estabilidad del sistema farmacéutico a través de la determinación del potencial zeta con DLS

Para estudiar, la estabilidad de las partículas del nanogel, el nanogel recubierto y el nanogel recubierto con MTX sódico adsorbido; se midió su potencial zeta, utilizando DLS. Para determinarlo, se utilizó el equipo *Zetasizer Nano ZS* y una celda de vidrio. Se prepararon diluciones de cada sistema, tomando 25 µL de nanogel y diluyendo con 3.9 mL agua desionizada. Las mediciones se realizaron por triplicado a 25°C.

5.6 Estudios de liberación *in vitro* del MTX sódico

Para determinar la funcionalidad del nanogel desarrollado, se realizaron estudios de liberación *in vitro* a diferentes condiciones. Las determinaciones efectuadas se realizaron por triplicado a pH 7.4 y 25°C; pH 7.4 y 37°C; así como pH 5 y 37°C; y pH 5 y 39.5°C. Para ajustar las condiciones, se utilizaron disoluciones amortiguadoras de fosfatos $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M de pH 7.4; y una de citratos $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.1 M de pH 5. El control de la temperatura se realizó con un recirculador.

Se creó un sistema en el que se utilizaron dos celdas de Franz verticales modificadas que se unieron, dejando entre ellas una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 12 a 14 KDa. Éste se esquematiza en la Figura 25. En la celda vertical inferior se colocaron 10 mL de nanogel disueltos con 5 mL de agua destilada, mientras que la celda superior permaneció vacía. Para tomar muestra, se aplicó presión de vacío en la celda superior, de manera que se hizo pasar la disolución de un compartimento al otro. Con esto, se esperaba que la

membrana retuviera al sistema con el MTX adsorbido y que únicamente dejara pasar al fármaco libre que se encontraba en disolución. Se recolectó toda la disolución obtenida y se reconstituyó la celda de abajo con otros 5 mL de medio. La toma de muestra se realizó en los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 24, 30 y 36 horas del experimento. Las muestras se leyeron usando un espectrofotómetro *Ocean Optics* con una fuente *DT-Mini-2-GS* y comparando con una curva de calibración del MTX sódico en la disolución amortiguadora correspondiente. Para el ajuste de los datos con los modelos teóricos de liberación se usó el *DDSolver 1.0* para *Excel*.

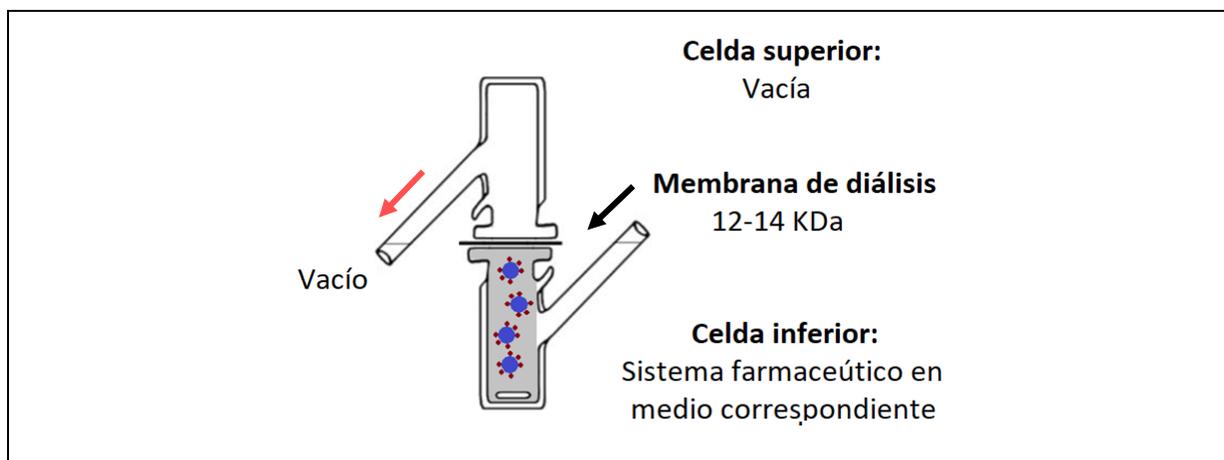


Figura 25. Sistema con celdas de *Franz* modificadas empleado para la liberación de MTX de sistema.

Capítulo 6. Resultados y discusión

6.1 Síntesis de nanogeles

El desarrollo de un nanogel sensible a las condiciones de pH y temperatura presentadas en las articulaciones inflamadas por la artritis reumatoide, requirió de la adecuada selección del tipo de monómero y entrecruzador a emplear, así como de las proporciones entre ellos.

Para escoger los materiales a utilizar en este trabajo, se consideraron monómeros biocompatibles y biodegradables o metabolizables que fueran solubles en agua y que además pudieran conferir al sistema, la sensibilidad al pH y la temperatura.

Está muy documentado el uso de la NIPAM para la generación de geles termosensibles,¹¹³ debido a que su LCST de 32°C, es muy cercana a la temperatura corporal.⁷⁹ Esto no se cumple con otras poli(acrilamidas N-sustituidas como la N,N-dietilacrilamida o la N-ciclopropilacrilamida, que tienen valores de LCST de 25 y 58°C, respectivamente.¹¹⁴ Por eso se eligió a la NIPAM para el desarrollo de estos nanogeles.

La copolimerización de NIPAM con monómeros hidrofílicos permitió incrementar el valor de la LCST,⁸⁰ asemejándola aún más a los 36.5°C del cuerpo o a los 38 y 39.5°C, que caracterizan a los procesos inflamatorios desencadenados por la artritis reumatoide. Para tener un mejor control en el desplazamiento de la LCST, se prefirieron utilizar monómeros de bajo peso molecular,¹¹⁵ de manera que los cambios presentados en las transiciones no fueron drásticos. Por otro lado, debido a los grupos funcionales ionizables que contenían los monómeros hidrofílicos utilizados, se pudo obtener un sistema que además de ser sensible a la temperatura, lo fue al pH.¹¹⁶

Para este nanogel, se buscó la inclusión de un monómero básico de bajo peso molecular que estuviera protonado al pH ácido que prevalece en las articulaciones artríticas, de manera que se favoreciera el estado hinchado del sistema. Es por ello, que se consideraron algunos tipos de monómeros con grupos nitrogenados aromáticos como la piridina y el imidazol, que tienen un pK_a de 5.2 y 6.9,¹¹⁷ respectivamente.

Los monómeros derivados de la piridina como la 2-vinilpiridina y la 4-vinilpiridina; se descartaron, debido a su bajo pK_a, lo cual requeriría de condiciones muy ácidas para mantener al sistema protonado. En cambio, los monómeros derivados del imidazol fueron más útiles, puesto que el pH cercano a 5 en los tejidos artríticos, permitiría mantener al sistema hinchado, pero el pH cercano a 7.4 del resto del cuerpo, propiciarían a su colapso. Dentro de los derivados vinílicos del imidazol, se encuentra el N-vinilimidazol y el 1-vinilimidazol (1VI). En el primero se favorece la deslocalización electrónica de los dobles enlaces del heterociclo, de manera que se pierde la basicidad de la molécula,¹¹⁸ lo cual no se observa con el 1VI, dado que uno de los átomos de nitrógeno está comprometido al enlazarse con un carbono insaturado, eliminándose los efectos resonantes. Es por ello por lo que el monómero para polimerizar con la NIPAM utilizado en este trabajo fue el 1VI.

La síntesis de nanogeles se efectuó a través la polimerización por radicales libres. La formación de radicales libres requiere del empleo de sustancias que los favorezcan; como iniciadores, que usualmente se acompañan de catalizadores. El tipo de iniciador y catalizador elegido para la síntesis, así como las proporciones utilizadas, repercuten en el grado en el que los monómeros reaccionan, lo cual a su vez influye en el peso molecular del polímero obtenido y en las propiedades físicas de éste.¹¹⁹

La gelificación de la NIPAM requiere combinaciones entre los iniciadores: APS o persulfato de potasio (KPS); y los catalizadores metabisulfito de sodio (SPS) o el TEMED.¹²⁰ En cuanto al iniciador, se prefiere el uso del APS dado que su solubilidad en agua (835 mg/ml a 25°C)¹²¹ es muchas veces mayor que el KPS (17.5 mg/ml a 25°C),¹²² lo cual favorece el rendimiento de la reacción. El TEMED es capaz de acelerar la reacción de polimerización hasta 3 veces,¹²³ al formar un complejo de transferencia de cadena, que da resultado tres tipos principales de radicales libres; uno derivado de sí mismo, otro a partir del persulfato, y otro más que proviene de su hidrólisis.¹²⁴ Tanto el SPS como el TEMED promueven la descomposición del APS en radicales libres, a través de la formación de un sistema rédox. El par más comúnmente usado es el sistema APS-TEMED, sin embargo, hay reportes que indican que el APS-SPS es igualmente funcional y que incluso podría llegar a formar polímeros más homogéneos.¹²³ Desafortunadamente, ha sido muy poco estudiado, por lo que para este proyecto, se eligió utilizar el par APS-TEMED.

Usualmente, se utilizan proporciones equimolares de APS y TEMED, sin embargo los reportes muestran, que la preparación de geles basados en pNIPAM, requieren una proporción molar APS: TEMED de 1 : 3,¹²⁴ con lo cual se obtiene un buen rendimiento de polimerización en un periodo de tiempo óptimo.¹¹⁹ En esta síntesis se optó por fijar esta relación entre iniciador y catalizador.

La formación de geles de cualquier tamaño a través de la polimerización radicalaria requiere del uso de agentes entrecruzadores, los cuales son capaces de unir las cadenas lineales obtenidas. Sin el uso de este tipo de sustancias, las cadenas lineales formadas sólo se unirían físicamente entre ellas, pero el empleo de un entrecruzador permite la formación de entrecruzamientos químicos.²² Usualmente, los agentes entrecruzadores utilizados en polimerizaciones radicalarias son monómeros funcionalizados con dos grupos vinílicos.¹²⁵ Los más usados son los derivados del etilen(glicol)dimetacrilatos, de la metilbisacrilamidas y del divinilbenceno.¹²⁶

Para la síntesis de polímeros basados en NIPAM, se utiliza con frecuencia la N,N'-metilbis-acrilamida (MBA), debido a la similitud estructural entre ambas.¹²⁰ Dado que este nanogel fue basado en NIPAM, se utilizó a la MBA como agente entrecruzador.

Es importante controlar la cantidad de entrecruzador empleado en las reacciones de polimerización. La concentración de MBA no repercute el curso de la reacción, pero sí altera el balance hidrofóbico de los sistemas obtenidos, de modo que influye en el desplazamiento

de la LCST; además que puede afectar al tamaño de los nanogeles.⁵⁸ La MBA es más reactiva que la NIPAM, por lo que la adición de grandes cantidades genera agregados muy densos y muy poco estables.¹²⁷ Las proporciones de MBA utilizadas en este trabajo fueron del 2, 5 y 10% (m/m) con respecto a la cantidad total de monómeros. Esto considerando que las síntesis de nanogeles y microgeles reportadas no superaran el 12% (m/m) de entrecruzador. Las fórmulas químicas de los componentes seleccionados para la síntesis de los nanogeles se muestran en la Figura 26.

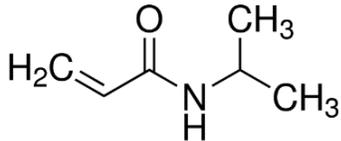
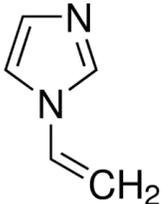
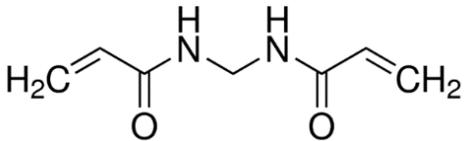
Monómero		Entrecruzador
NIPAM	1VI	MBA
		

Figura 26. Fórmulas químicas de los componentes seleccionados para la síntesis de nanogeles

La estabilidad del sistema, el tamaño de partícula, el índice de polidispersión (PDI, por sus siglas en inglés por *Polydispersity Index*) y el rendimiento de reacción dependieron del método y las condiciones en la que se efectuó la reacción de síntesis.

El medio de reacción utilizado para la síntesis de los nanogeles fue agua. En primera instancia, porque se busca que los sistemas formados interactuen con ella; hinchándose y colapsándose ante diferentes condiciones. Se ha reportado, la síntesis de geles macrométricos utilizando otro tipo de disolventes orgánicos. Incluso hay evidencia que la formación de hidrogeles de NIPAM podría verse favorecida utilizando DMSO,¹²⁰ pero en este caso no resultaba viable, porque complicaría la total extracción del disolvente de la estructura nanométrica. Para esta síntesis, el uso del agua como disolvente es adecuado, puesto que todas las sustancias utilizadas para la formación del nanogel son solubles. Ya se mencionó que particularmente el APS tiene muy buena solubilidad en agua, pero de igual manera; la NIPAM y la MBA, tienen una solubilidad a 25°C de; 30.77 mg/mL¹²⁸ y 1 mg/mL,¹²⁹ respectivamente; además que tanto el 1VI, como el TEMED son líquidos miscibles en agua.

Otro aspecto importante, respecto al disolvente, es la cantidad empleada en la síntesis. De acuerdo con las teorías de formación de nanogeles, se sabe que una condición necesaria para la obtención de estructuras nanométricas es el uso de medios diluidos. La cantidad de agua en la polimerización repercute en el tamaño molecular de los nanogeles, y por otro lado, también influye en el rendimiento obtenido en la reacción.³¹ Para conocer la cantidad de agua ideal para la síntesis, ésta se efectuó a diferentes volúmenes; utilizando 20, 200 y 500 mL de agua, sin embargo no se encontró una diferencia significativa en los tamaños de

partícula obtenidos, reportados como d_H , de acuerdo con el ANOVA realizado con un 95% de confianza; por otro lado respecto al PDI, el ANOVA generado muestra una diferencia significativa al considerar un α de 0.05, sin embargo, dado que el valor numérico fluctúa entre los 0.3 y 0.5, se consideró que los 3 volúmenes empleados generan partículas de nanogel de tamaño uniforme. Por estas razones, se optó por fijar la cantidad de 20 mL de agua. Los ANOVA se presentan en los Anexos 1 y 2; mientras que la Tabla 9, muestra los valores obtenidos.

Tabla 9. d_H y PDI promedio al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles.

Volumen (ml)	d_H (nm)	PDI
20	322.3	0.476
200	316.7	0.308
500	304.7	0.316

La obtención de nanogeles por polimerización por emulsión implica el uso de agentes tensoactivos que son difíciles de retirar, por lo que la polimerización por precipitación resultó una buena alternativa para evitar dichas sustancias.³⁵ Anteriormente, ya se revisó el fundamento de este método y se mencionó la necesidad de monómeros cargados que sean capaces de generar agregados electrostáticamente inestables que coalescen durante el curso de la reacción. En este caso, el 1VI posee nitrógenos protonables a un pH ligeramente ácido. De manera que para lograr la generación de nanogeles a través del método de polimerización por precipitación, se fijó el pH del medio a 6.8 con HCl. Es por ello por lo que se pudieron generar partículas de nanogel sin la necesidad de utilizar grandes cantidades de agua. Cabe destacar, que no se usó un pH más bajo para no protonar al TEMED, cuyo pK_a es de 5.85, porque de lo contrario, su capacidad catalizadora se pudo haber reducido.¹¹⁹

Otro parámetro que repercute en la síntesis de nanogeles es la temperatura, pues tiene un efecto directo en el grado de polimerización, pero también en las características físicas de las partículas obtenidas.¹¹⁹ Muchas referencias científicas reportan utilizar temperaturas entre 50 y 75°C.¹²⁰ Esto a pesar que las reacciones de polimerización sean exotérmicas.¹¹⁹ La temperatura de la reacción puede disminuirse utilizando agentes catalizadores como el TEMED, puesto que decrementa la energía de activación necesaria para empezar la reacción.¹²⁴ A pesar de esta información, no existe un consenso respecto a qué temperatura utilizar para la generación de nanogeles. Algunas fuentes bibliográficas, recomiendan que usando TEMED, la temperatura para la polimerización podría disminuirse entre 23 y 25°C,¹¹⁹ pero otras afirman que debe ser entre 37-45°C,¹²⁰ mientras que unos cuantos más, reportan la realización de sus reacciones a altas temperaturas.¹²⁴ Algunos artículos indican que el uso de muy altas temperaturas genera estructuras de nanogel muy compactas con baja polidispersibilidad.¹¹⁴ Para este trabajo se decidió utilizar 30°C, dado que no hubo una diferencia sustancial en los resultados al utilizar temperaturas mayores.

6.2 Caracterización de nanogeles

6.2.1 Determinación de la LCST del nanogel mediante turbidimetría

Se evaluó la LCST de diversas formulaciones de nanogel ante cambios de temperatura y pH, usando la técnica de turbidimetría. Para obtener mediciones confiables se utilizaron muestras diluidas, con concentraciones de nanogel de 0.0028 g/mL. Esto porque los estudios que se consultaron indican que el uso de concentraciones de nanogel menores a 0.01% (m/V) permitirían despreciar las interacciones entre partículas.²²

Los resultados experimentales obtenidos muestran que el nanogel elaborado únicamente con NIPAM tiene una LCST de 33°C. En la Figura 27 se aprecia que la LCST obtenida no varía al cambiar el pH del medio.

La LCST indica que, por debajo de 33°C, los grupos amida de la NIPAM forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del medio, lo cual favorece su entrada al nanogel, generando una estructura hidrofílica e hinchada. La interacción de los nanogeles con el agua favorecen su disolución en el medio, razón por la cual cuando un rayo de luz incide a través de una muestra, ésta no la absorbe y lo deja pasar a través de ella. Como resultado, la intensidad de luz incidente es igual a la transmitida, por lo que el valor de transmitancia obtenido es muy cercano al 100%. Por el contrario, a temperaturas superiores a 33°C, no se ve favorecida la formación de puentes de hidrógenos, pero sí las interacciones hidrofóbicas entre el esqueleto hidrofóbico y los grupos isopropilo de las moléculas de NIPAM, lo cual ocasiona que las cadenas poliméricas que conforman al nanogel se aglomeren. La falta de afinidad del agua con el nanogel implica su salida del sistema, lo que se traduce en su colapso. La solubilidad de los nanogeles colapsados en el medio disminuye drásticamente, de manera que la disolución se vuelve turbia, al no dejar pasar la luz, lo que resulta en una disminución en la transmitancia que puede llegar a cero. Esto se muestra en la Figura 28.

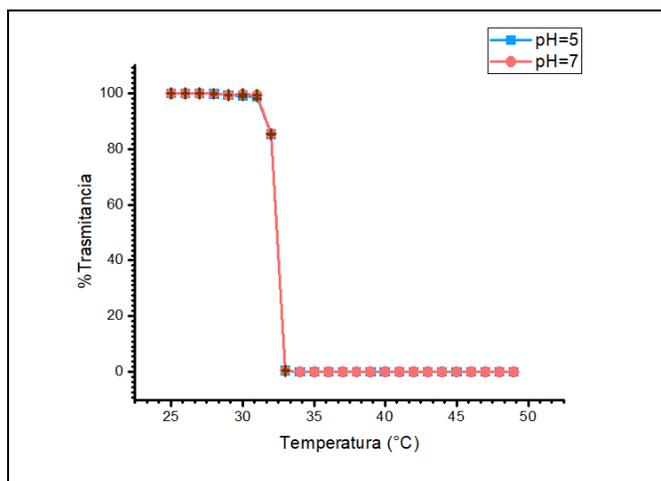


Figura 27. Determinación de LCST de nanogel compuesto 100% por pNIPAM

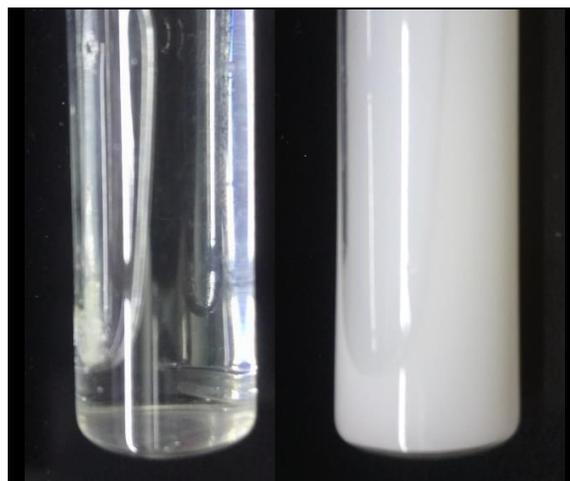


Figura 28. Transición de fase en nanogel compuesto 100% por pNIPAM en estado: a) hinchado (izquierda); y b) colapsado (derecha)

La LCST de los nanogeles de NIPAM se alteró al copolimerizarlo con 1VI y MBA. La primera variable que se estudió fue el efecto de la proporción de 1VI en la LCST. La adición de un residuo hidrofílico como el 1VI permitió incrementar la LCST del sistema. Esto porque el 1VI contiene átomos de nitrógeno que pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, favoreciendo el carácter hidrofílico del nanogel. Por esta razón se necesita una mayor temperatura para provocar una transición de fase. De esta manera, a mayor cantidad de 1VI, la LCST fue más grande. Esto es lo que se observa en la Figura 29; y en la Tabla 10, en donde se muestran los resultados de la determinación de la LCST de formulaciones de nanogel que contienen una cantidad fija de entrecruzador del 2% (m/m) y 5, 7.5, 10 y 15% (m/m) de 1VI, con respecto al total de NIPAM, obteniendo valores de LCST a pH 7 de 36, 36.5, 38 y 40.5 °C, respectivamente.

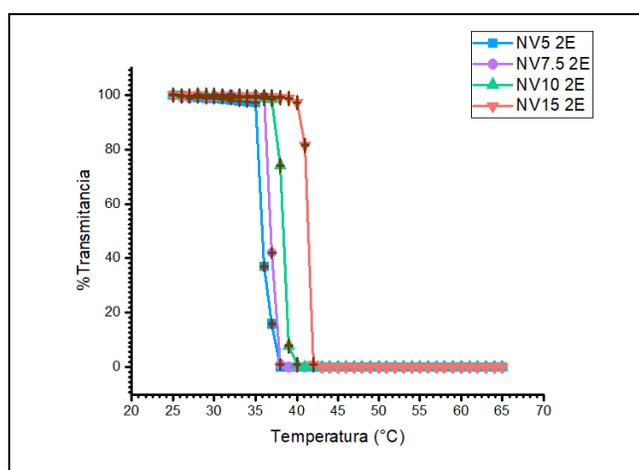


Figura 29. Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 2% (m/m) de MBA

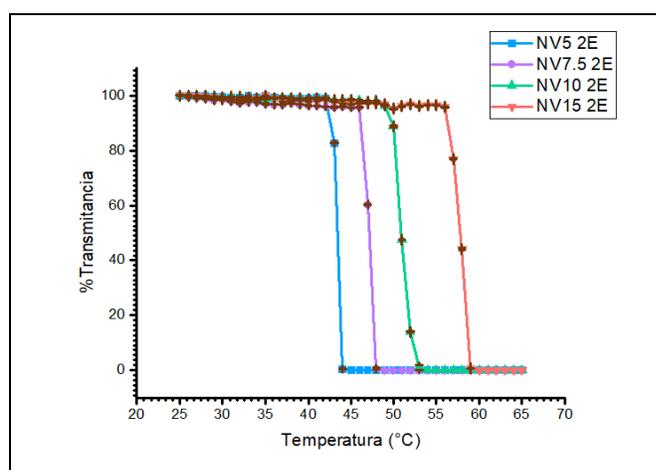


Figura 30. Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 2% (m/m) de MBA

Tabla 10. LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 2% (m/m) de MBA

Formulación	LCST (°C)	
	pH=5	pH=7
NV5 2E	43	36
NV7.5 2E	47	36.5
NV10 2E	50	38
NV15 2E	57	40.5

El 1VI actuó como electrolito débil, debido a su capacidad de ionización, por lo que se esperaba que la LCST dependiera del pH del medio.¹³¹ La influencia del pH en la LCST va en función al pK_a del 1VI, que es de 6.26.¹³² Cuando los nanogeles con 1VI se encuentren en un medio con un pH menor a su pK_a ; como a un pH de 5, su nitrógeno ionizable se protonará, por lo que adquirirá una carga parcial positiva. La aparición de cargas electrostáticas del

mismo valor provocará repulsión entre los grupos protonados, lo cual favorecerá la entrada de agua, de manera que el sistema tendrá mayor hidrofilia y como resultado la LCST será más grande.

Cuando el nanogel esté en un medio con un pH mayor a su pK_a ; como a un pH de 7, su nitrógeno ionizable se desprotonará, por lo que no presentará carga electrostática. La neutralidad de carga en el sistema propiciará a que su hidrofilia únicamente se deba a los puentes de hidrógeno entre los grupos hidrofílicos de sus cadenas poliméricas y el agua, de manera que se obtiene un sistema menos hidrofílico en comparación al obtenido a pH menores, resultando en un aparente colapso de la estructura.

Estos fenómenos, se aprecian en la Figura 30; y en la Tabla 10, que muestra los resultados de la LCST a pH de 5 con los nanogeles con 2% (m/m) de entrecruzador y 5, 7.5, 10 y 15% (m/m) de 1VI, con respecto al total de NIPAM. Se observa un aumento en la LCST, respecto a la determinada a un pH de 7, obteniéndose los valores de 43, 47, 50 y 57°C, respectivamente. Cabe señalar, que, a pesar del incremento en la LCST, se mantuvo el efecto al usar mayores cantidades de 1VI.

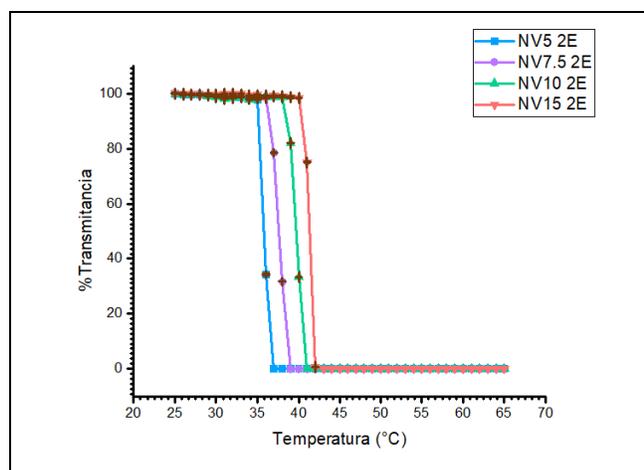


Figura 31. Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 5% (m/m) de MBA

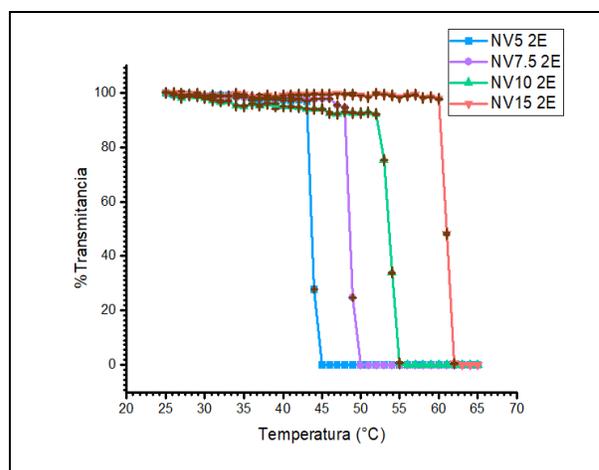


Figura 32. Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 5 (NV5 2E), 7.5 (NV7.5 2E), 10 (NV10 2E) y 15% (NV15 2E) de 1VI y 5% (m/m) de MBA

Tabla 11. LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 5 (NV5 5E), 7.5 (NV7.5 5E), 10 (NV10 5E) y 15% (NV15 5E) de 1VI y 5% (m/m) de MBA

Formulación	LCST (°C)	
	pH=5	pH=7
NV5 5E	44	36
NV7.5 5E	49	37
NV10 5E	53	39
NV15 5E	61	41

La influencia de la proporción de 1VI en el nanogel se mantuvo en formulaciones con 5% (m/m) de entrecruzador en ambos pH, tal como se aprecia en las Figura 31 y Figura 32; y Tabla 11. Los ANOVA realizados para ambos casos indican que con una α de 0.05, sí existe una diferencia significativa en el desplazamiento de la LCST al utilizar diferentes cantidades de 1VI. Lo mismo ocurre al utilizar medios con pH de 7 y de 5. Estos se presentan en los Anexos 3 y 4.

También se evaluó el efecto del porcentaje de MBA, en la LCST a pH 5 y 7. Los resultados se muestran en las Figura 33, Figura 34 y Tabla 12; y Figura 35, Figura 36 y Tabla 13; para 5 y 7.5% (m/m) de 1VI, respectivamente.

La MBA es un monómero hidrofílico, de manera que se esperaba que su efecto en el desplazamiento de la LCST fuera similar al presentado en el 1VI, debido a los dos grupos amida que contiene en su estructura. En realidad, dado que todas las formulaciones consideradas contienen cierta proporción de MBA y 1VI, se puede decir que el aumento de hidrofilia se debe a ambos.

Para verificar la influencia de la MBA en los nanogeles, se realizó esta medición utilizando cantidades fijas de 1VI y un porcentaje de 2, 5 y 10% (m/m) de entrecruzador. A diferencia de los resultados conseguidos en los sistemas en donde se fijó el entrecruzador y se varió la proporción de 1VI, el aumento en la LCST no fue significativo al incrementar el porcentaje de MBA. Esto considerando un nivel de confianza del 95%, según el ANOVA realizado, que se presentan en los Anexos 5 y 6. De esta manera, la cantidad de entrecruzador que se adicionó no fue muy grande para generar efectos más drásticos. Es importante observar, que la sensibilidad al pH que confiere el 1VI es independiente de la cantidad de MBA usado, puesto que ésta última no posee grupos ionizables.

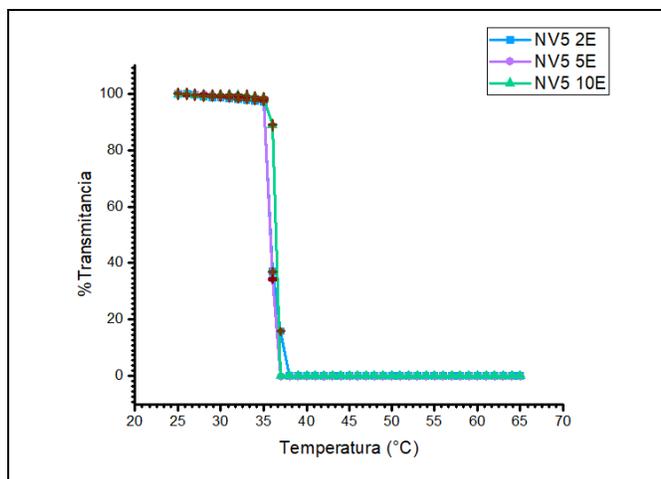


Figura 33. Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 5% de 1VI y 2 (NV5 2E), 5 (NV5 5E) y 10% (NV5 10E) (m/m) de MBA

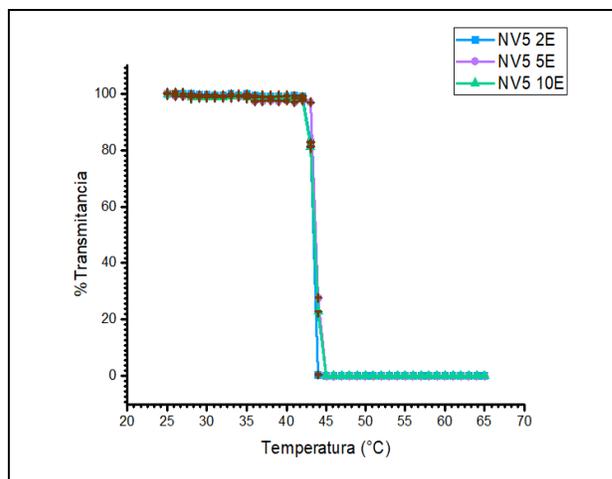


Figura 34. Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 5% de 1VI y 2 (NV5 2E), 5 (NV5 5E) y 10% (m/m) (NV5 10E) de MBA

Tabla 12. LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) (m/m) de MBA

Formulación	LCST (°C)	
	pH=5	pH=7
NV5 2E	47	36
NV5 5E	49	36
NV5 10E	49	37

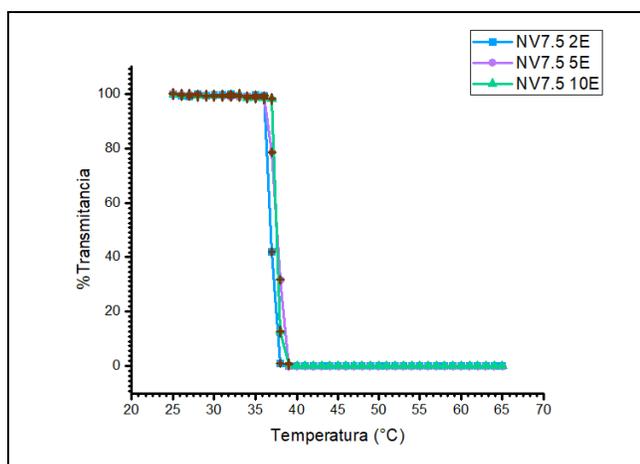


Figura 35. Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel con: 7.5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) (m/m) de MBA

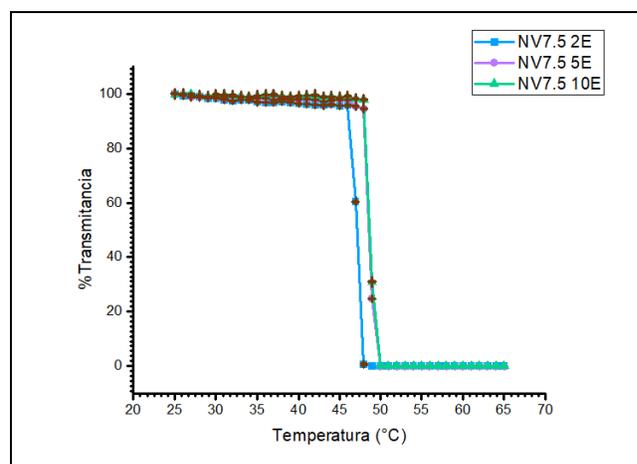


Figura 36. Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel con: 7.5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) (m/m) de MBA

Tabla 13. LCST a pH 5 y 7 de nanogel con: 7.5% de 1VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) (m/m) de MBA

Formulación	LCST (°C)	
	pH=5	pH=7
NV7.5 2E	43	36.5
NV7.5 5E	44	37
NV7.5 10E	44	38

Con este trabajo se buscó un nanogel que fuera capaz de liberar al fármaco exclusivamente en las articulaciones inflamadas debido a la artritis reumatoide. Los tejidos artríticos presentan una elevación en la temperatura, pasando de entre 36.5 y 37.2°C a entre 38 y 39.5°C,¹⁶ además de una alteración en el pH, cambiando de 7.4 a 5.¹⁵ De esta manera, el sistema generado debería ser capaz de mantenerse hinchado a temperaturas superiores a la corporal y un pH ácido, de manera que el fármaco contenido se pudiera liberar mediante difusión. Por otro lado, a condiciones fisiológicas normales, el sistema debería mantenerse colapsado, a modo que la liberación del principio activo fuera más lenta. Con esto se podría asegurar la llegada de mayor cantidad de fármaco a los tejidos inflamados, disminuyendo

su presencia en otros tejidos no enfermos para evitar efectos secundarios. El nanogel elaborado que cumplió con la sensibilidad a pH y temperatura deseada, corresponde a las formulaciones en las que se emplearon 7.5% (m/m) de 1VI con 2, 5 y 10% (m/m) de MBA.

6.2.2 Obtención del tamaño de partícula del nanogel a través de DLS

El tamaño de partícula de los nanogeles puede estar influenciado por: la concentración inicial de los monómeros que lo forman, la cantidad de iniciador empleado, la proporción de entrecruzador usada, así como la temperatura de la síntesis.¹³³ En este caso, la única variable que se exploró fue la cantidad de MBA utilizada en la síntesis. La dependencia de la cantidad de MBA con el tamaño de partícula tiene que ver con el grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, así como la interacción del sistema con el disolvente, misma que puede variar de acuerdo con los estímulos externos del medio.¹³³ La adición de mayores cantidades de MBA en las formulaciones de nanogel, disminuyó la capacidad de hinchamiento de las estructuras,^{58, 134, 135} debido a que se favorecieron los entrecruzamientos entre las cadenas poliméricas, de manera que se aumentó la rigidez del sistema y se complicó la entrada de agua. Lo contrario sucedió al utilizar una baja concentración de MBA. En este caso, existió una mayor flexibilidad y movilidad en las cadenas poliméricas, lo cual facilitó la entrada de disolvente a la estructura, favoreciendo su hinchamiento y aumentando su tamaño. Dado que la cantidad de entrecruzador afecta la manera en la que el agua interactúa con los nanogeles, se esperaba que ésta influyera en la temperatura de transición, que en este caso se concibió como VPTT,⁸¹ haciendo alusión a los cambios en el tamaño de las partículas, debido a las transiciones entre un estado hinchado y uno colapsado.

Los ensayos de turbidimetría realizados en la sección anterior no mostraron una diferencia significativa en la LCST al variar la cantidad de MBA. De manera que se procedió a la obtención de la VPTT a través de DLS en las formulaciones que poseen 7.5% (m/m) de VI con 2, 5 y 10% (m/m) de MBA. Los resultados obtenidos del d_H y el PDI con un medio de pH 7, se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. d_H y PDI de nanogeles con 7.5% de VI y 2 (NV7.5 2E), 5 (NV7.5 5E) y 10% (NV7.5 10E) (m/m) de MBA

%MBA	d_H (nm)	PDI
NV7.5 2E	336.1	0.479
NV7.5 5E	325.2	0.431
NV7.5 10 E	293.3	0.454

Los valores de d_H indican que el aumento en la cantidad de entrecruzador, disminuye el tamaño de las partículas de nanogel. Los ANOVA realizados, que se muestran en los Anexos 7 y 8, evidencian que con un 95% de confianza, el porcentaje de MBA usado provocó una variación en el d_H en las partículas de nanogel. Por otro lado, se aprecia que no existió

diferencia significativa entre los PDI obtenidos. Debido a esto último y aunado a que la disminución del d_H no sobrepasa el 15%, se decidió que la formulación NV7.52E posee las características buscadas en el sistema de liberación para la artritis reumatoide que se planteó, razón por la cual las determinaciones siguientes fueron enfocadas a este nanogel.

Se realizó la determinación de la VPTT del nanogel NV7.52E, midiendo el d_H del sistema a diferentes temperaturas en pH 5 y 7. Los resultados obtenidos se muestran en las Figura 37, Figura 38; y en la Tabla 15. Se observa que los valores de VPTT son muy parecidos a los de LCST para ambos pH. Es decir, se obtuvieron valores de VPTT de 45 y 35°C a pH de 5 y 7, respectivamente. A pH 5, el nanogel se encontraba hinchado a temperaturas menores a 45°C y colapsado por arriba de ella; mientras que a pH de 7, la transición se dio a 35°C. Por otro lado, se observó que no existe un cambio significativo en los valores de PDI, lo cual es indicio de que las partículas de nanogel no se aglomeraron al variar la temperatura.

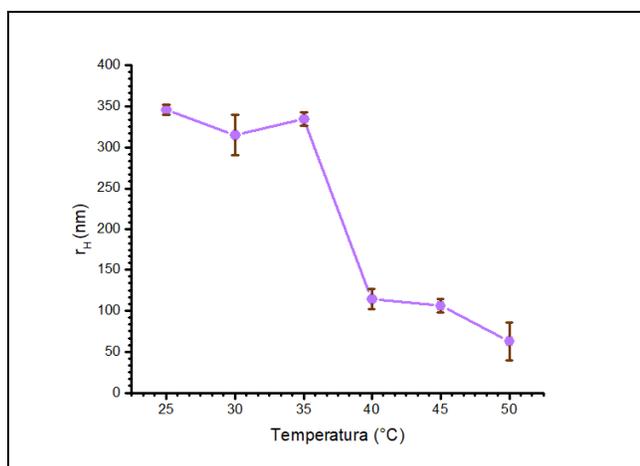


Figura 37. Determinación de VPTT a pH de 7 en nanogel NV7.5 2E

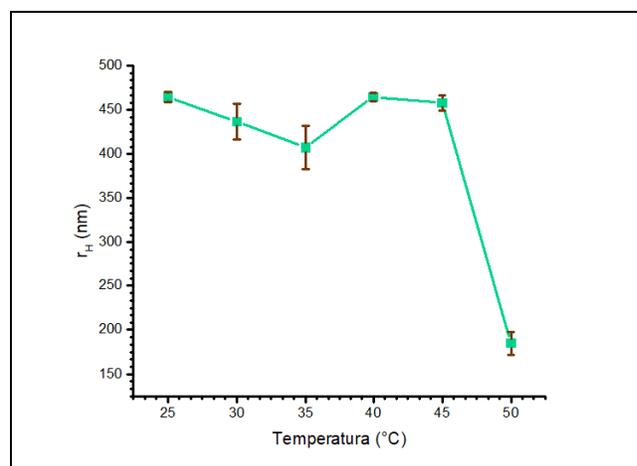


Figura 38. Determinación de VPTT a pH de 5 en nanogel NV7.5 2E

Tabla 15. d_H y PDI a de nanogel NV7.5 2E para la obtención de su VPPT a pH 5 y 7

Temperatura (°C)	pH=5		pH=7	
	d_H (nm)	PDI	d_H (nm)	PDI
25	463.06667	0.30733	328.76667	0.49233
30	432.56667	0.354	293.36667	0.485
35	439.23333	0.17667	325.1	0.49033
40	465.9	0.36333	101.2	0.402
45	459.9	0.23633	98.31	0.37233
50	173.43333	0.372	49.07	0.405

Se aprecia que los nanogeles en medios ácidos fueron alrededor de 100 nm más grandes que en medios neutros. Esto porque a pH 5, los átomos de nitrógeno del 1VI, se

encontraban protonados. La presencia de cargas electrostáticas en la estructura provocó la repulsión entre las cadenas poliméricas que la componen, lo que favoreció la entrada de mayores cantidades de agua. Los ANOVA generados para estas mediciones se detallan en los Anexos 9 y 10.

El grado de hinchamiento de los nanogeles (S_w) muestra la cantidad de veces que el sistema incrementa su tamaño. Para calcularse se aplicó la siguiente relación entre el d_H del estado hinchado (V) y el del estado colapsado (V_c):¹³⁶

$$S_w = \frac{V}{V_c}$$

Para esta determinación, se consideró el d_H promedio en el que el sistema se encontraba hinchado, es decir: 25, 30, 35, 40 y 45°C para pH de 5; mientras que, para el estado colapsado, se tomó en cuenta el d_H promedio del nanogel en las temperaturas restantes; o sea: 25, 30 y 35°C a un pH de 7. Los resultados obtenidos del S_w se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetro V y V_c y S_w del nanogel NV7.5 2E a pH 5 y 7

pH	\bar{V} (nm)	\bar{V}_c (nm)	S_w
5	451.5	173.4	2.60
7	315.8	99.6	3.16

El S_w resultó ser mayor a pH neutro. Esto quiere decir que aún en su estado colapsado, el nanogel a pH ácido es más hidrofílico que en el medio neutro. De esta manera, la cantidad de agua que sale de la estructura es menor a la obtenida en pH 7. Para explicar esto primero hay que considerar que, a pesar de mantener una estructura colapsada, los nanogeles contienen cierta cantidad de agua en su interior.⁵⁸ Esto porque existen dos tipos de agua que interactúan con el nanogel: el agua libre, que representa la mayor cantidad de disolvente que interactúa con las cadenas poliméricas colgantes; así como, el agua de enlace, la cual se mantiene fuertemente unida a las cadenas poliméricas del interior de la estructura. El mayor carácter hidrofílico en los nanogeles a pH de 5, es un indicativo que no todo el 1VI que contiene el nanogel se encuentra ubicado en su superficie, de modo que existe cierta cantidad en su interior. Por esta razón, la desprotonación de los átomos de nitrógeno del 1VI que no están expuestos se dificulta.¹³⁷ La distribución del 1VI en el nanogel se muestra con más detalle más adelante.

Debido al método de síntesis, los nanogeles generados presentaron un tamaño relativamente mayor, en comparación a otros reportados en la literatura, sin embargo, esto no limita su uso como sistemas farmacéuticos, dado que el diámetro de los capilares sanguíneos más pequeños fluctúa entre los 5 y 10 μm ,¹³⁸ lo que haría factible su administración intravenosa. Sobre todo, porque de ser el caso, cuando el nanogel se administre y esté en circulación sistémica, se espera que las condiciones fisiológicas de la sangre lo mantengan colapsado y su d_H sea alrededor de 99.6 nm.

La artritis reumatoide conlleva a la formación del *pannus*, un tejido granulomatoso formado por la alteración de los vasos capilares en las zonas inflamadas.⁶ Como las fenestraciones del *pannus* tienen un diámetro entre 450 y 600 nm,⁹⁰ el nanogel colapsado podría ingresar fácilmente al tejido artrítico, pero su acceso se complicaría a otros tejidos sanos, dado que, en estas zonas, las fenestraciones de los capilares no supera los 60 nm.¹³⁸ Una vez dentro del tejido artrítico, sus condiciones de inflamación, harían que el tamaño de los nanogel fuera alrededor de 451.5 nm, de manera que su permanencia se favorecería a través de vectorización pasiva, debido al efecto EPR del *pannus*.⁹²

6.2.3 Estudio de la estructura química del nanogel mediante FTIR

Para comprobar la unión entre los monómeros y el entrecruzador que constituyen al nanogel, se obtuvieron los espectros FTIR de cada una de las materias primas, así como del nanogel NV7.52E. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 39, 40, 41 y 42, así como en las Tablas 17, 18, 19 y 20.

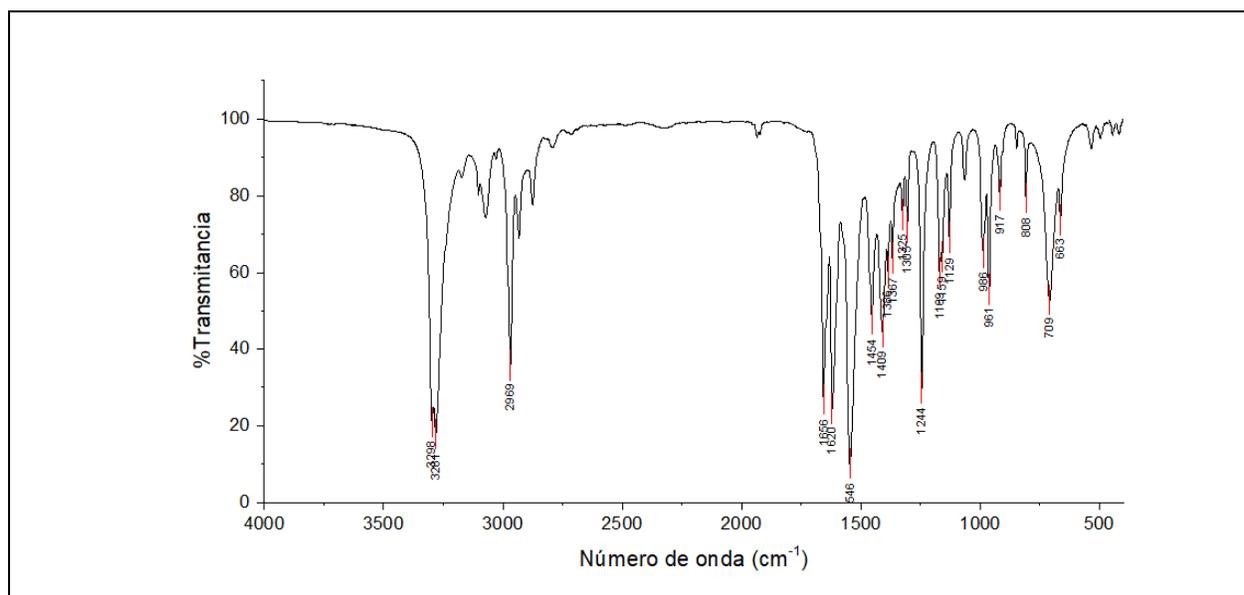


Figura 39. Espectro de IR del NIPAM

Tabla 17. Asignación de señales para el espectro de IR del NIPAM

Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Nota
3298 y 3284	-NH	Vibración de estiramiento
2969	-CH ₃	Vibración de estiramiento
1656	-C=O	Vibración de estiramiento
1620	-C=C	Flexión simétrica
1547	-NH	Flexión de tijera
1244	-NC	Vibración de estiramiento
709	-C _{sp} ² -H	Flexión de tijera

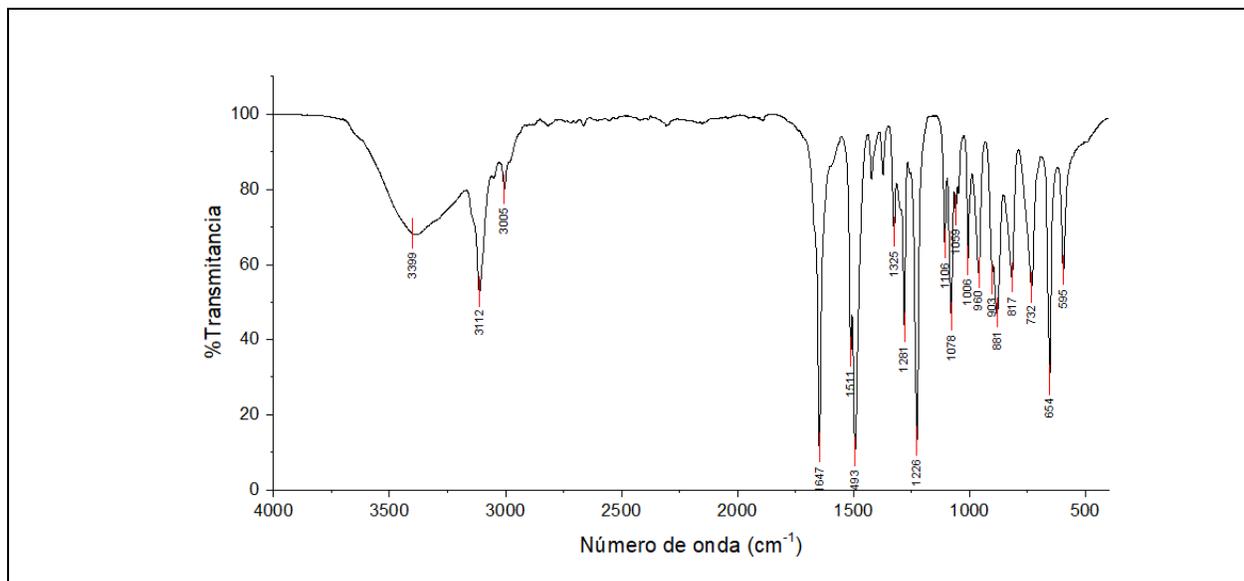


Figura 40. Espectro de IR del 1VI

Tabla 18. Asignación de señales para el espectro de IR del 1VI

Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Nota
3399	-C=NH aromático	Vibración de estiramiento
3312 y 3005	-CH aromático	Vibración de estiramiento
1647	-C=C	Flexión simétrica
1511 y 1493	-CH aromática	Vibración de estiramiento
1226	-NC	Vibración de estiramiento
732	-C _{sp} ² -H	Flexión de tijera

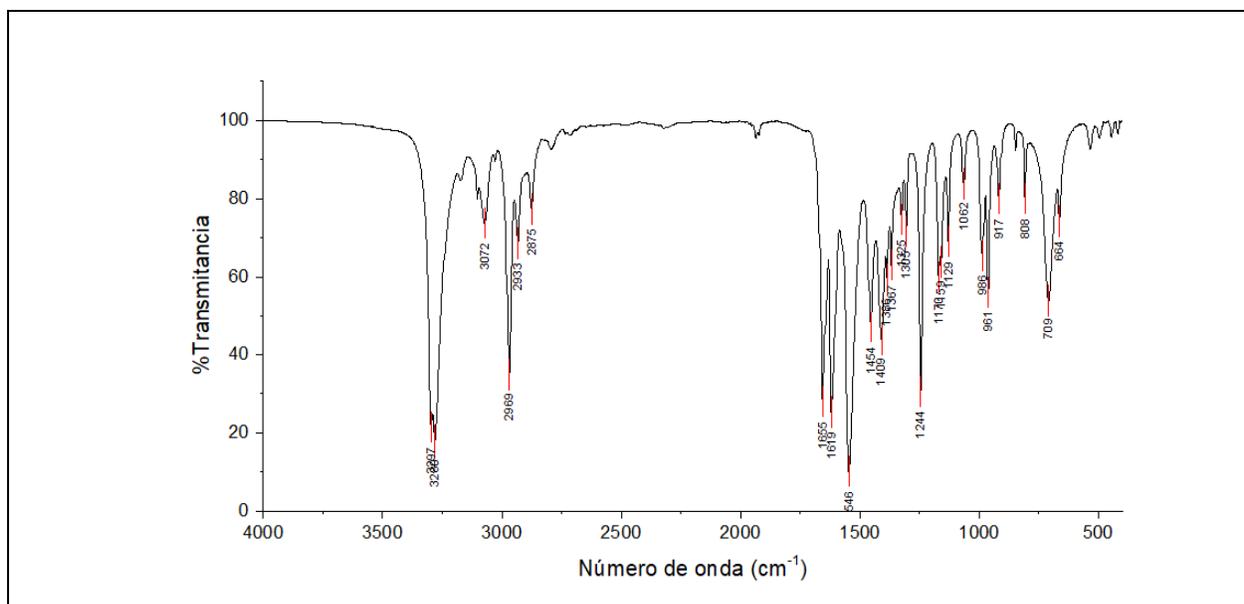


Figura 41. Espectro de IR del MBA

Tabla 19. Asignación de señales para el espectro de IR del MBA

Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Nota
3397 y 3288	-NH	Vibración de estiramiento
2969	-CH ₃	Vibración de estiramiento
1655	-C=O	Vibración de estiramiento
1619	-C=C	Flexión simétrica
1546	-NH	Flexión de tijera
1244	-NC	Vibración de estiramiento
709	-C _{sp} ² -H	Flexión de tijera

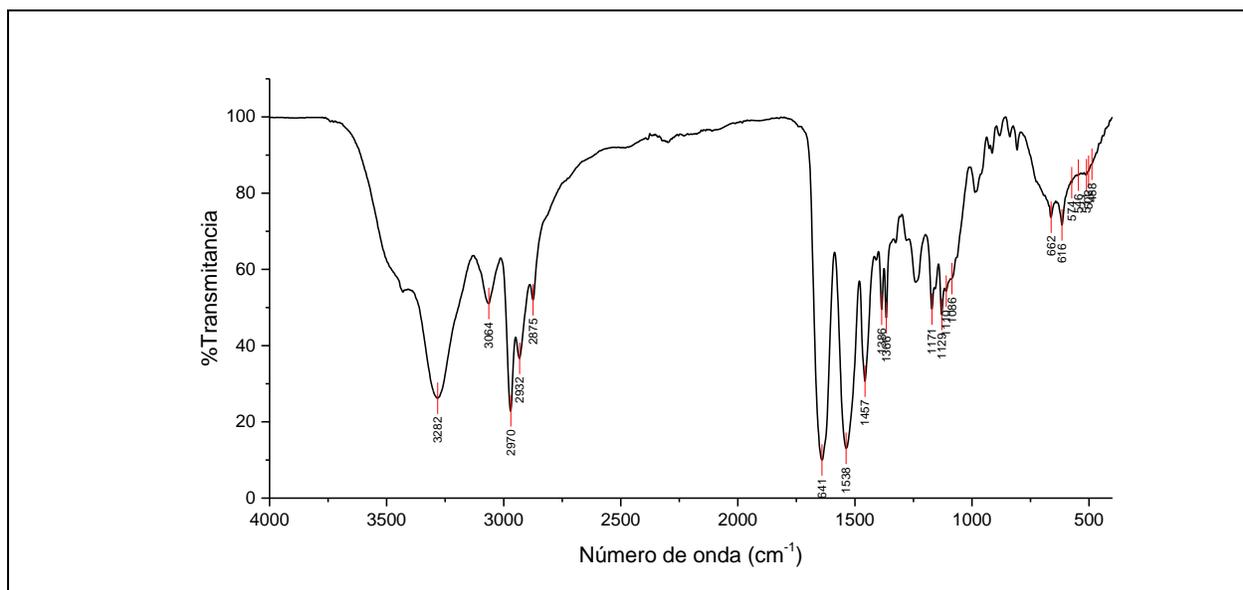


Figura 42. Espectro de IR del nanogel NV7.52E

Tabla 20. Asignación de señales para el espectro de IR del nanogel NV7.5 27

Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Nota
3282 y 3284	-NH	Vibración de estiramiento
3064	-C=NH aromática	Vibración de estiramiento
2970, 2932 y 295	-CH ₃	Vibración de estiramiento
1641	-C=O	Vibración de estiramiento
1538	-NH	Flexión de tijera
1457	-NH	Flexión de tijera

Las tablas anteriores muestran los grupos funcionales principales que caracterizan a cada sustancia. Se aprecia que la NIPAM es muy similar a la MBA en cuanto a los grupos funcionales que las conforman. Ambas muestran los grupos característicos de las amidas, aminas secundarias y grupos carboxilo, y también poseen las bandas correspondientes a los dobles enlaces. En el caso del 1VI, se aprecian las señales que implican la presencia de

grupos aromáticos nitrogenados, además del grupo vinílico. El espectro del nanogel muestra bandas anchas que son características de los sistemas polimerizados. En la Figura 42, se aprecia la desaparición de las señales correspondientes a los dobles enlaces, lo cual es indicio de la reacción entre los componentes. Por otro lado, se pueden identificar los grupos funcionales de los tres componentes, lo que comprueba su inclusión en el sistema.

6.2.4 Estudio de la estructura química en un nanogel mediante NMR

Para verificar la formación del nanogel a partir de las materias primas, se realizó un estudio con NMR mediante experimentos de protón. En primera instancia, se obtuvieron los espectros de las materias primas y posteriormente se contrastaron con el del nanogel, tal como se aprecia en las Figuras 43, 44, 45 y 46.

Como los monómeros son la unidad básica que estructuran al nanogel, se esperaba que para su formación vía polimerización por radicales libres, sus grupos vinílicos se rompieran.

En la Figura 43 se presenta el espectro ^1H NMR del NIPAM, en el que se aprecia una señal a 1.16 ppm que integra para 6 protones y que se asigna a los dos grupos metilo del isopropilo. En 3.98 ppm se observa un heptuplete correspondiente al metino del mismo grupo. En 6.22, 6.15 y 5.72 ppm se nota la aparición de 3 dobles de dobles, que integran cada uno para 1 protón, y que corresponden a los protones vinílicos de la molécula.

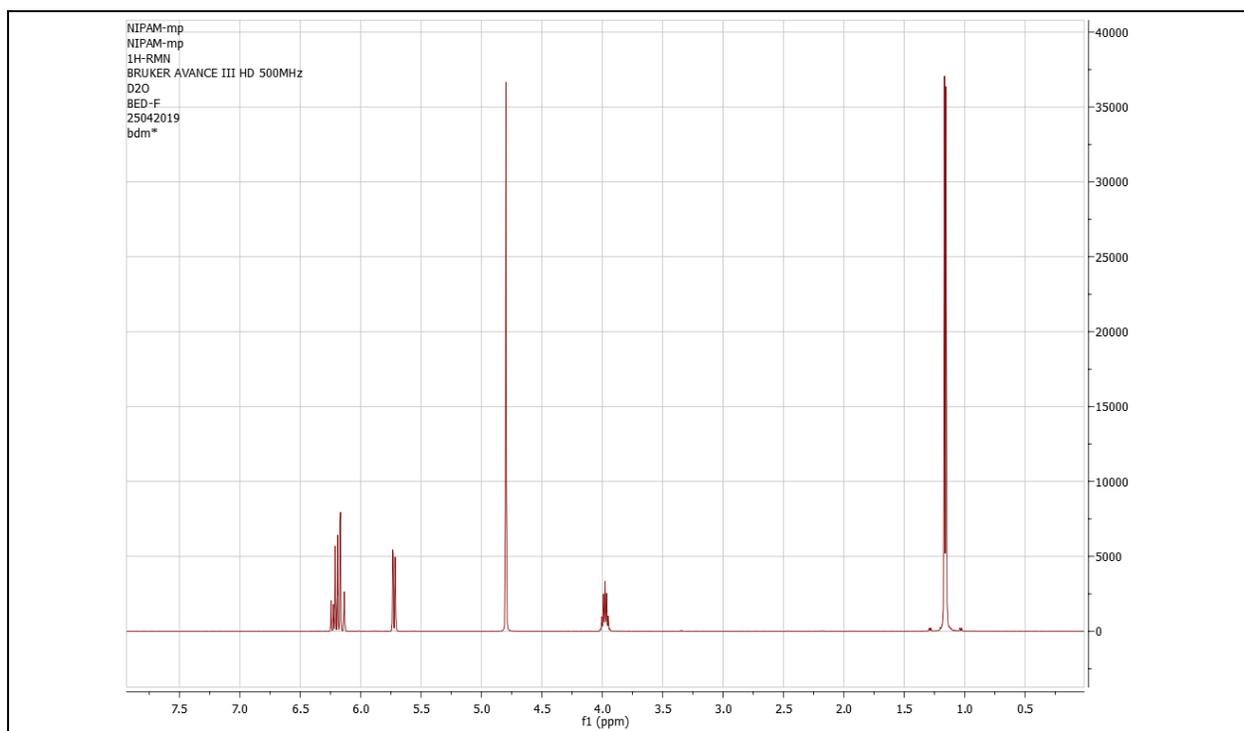


Figura 43. Espectro ^1H NMR para NIPAM

Capítulo 6. Resultados y discusión

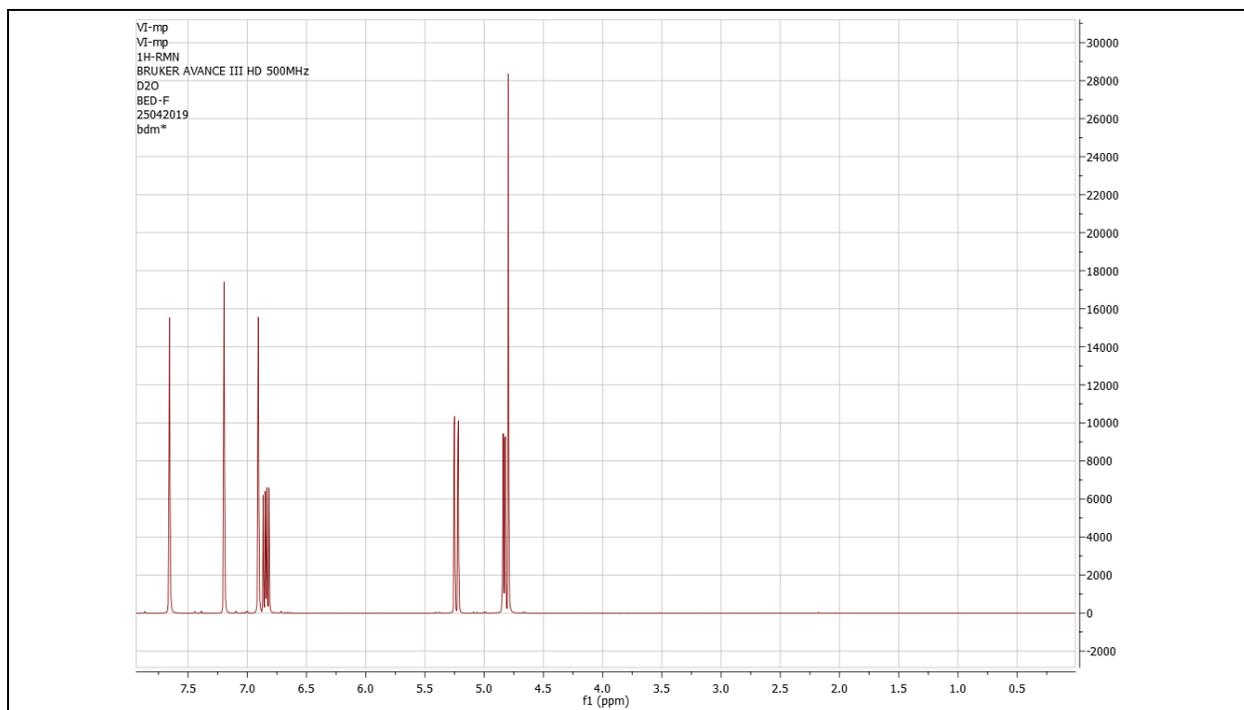


Figura 44. Espectro 1H NMR para 1VI

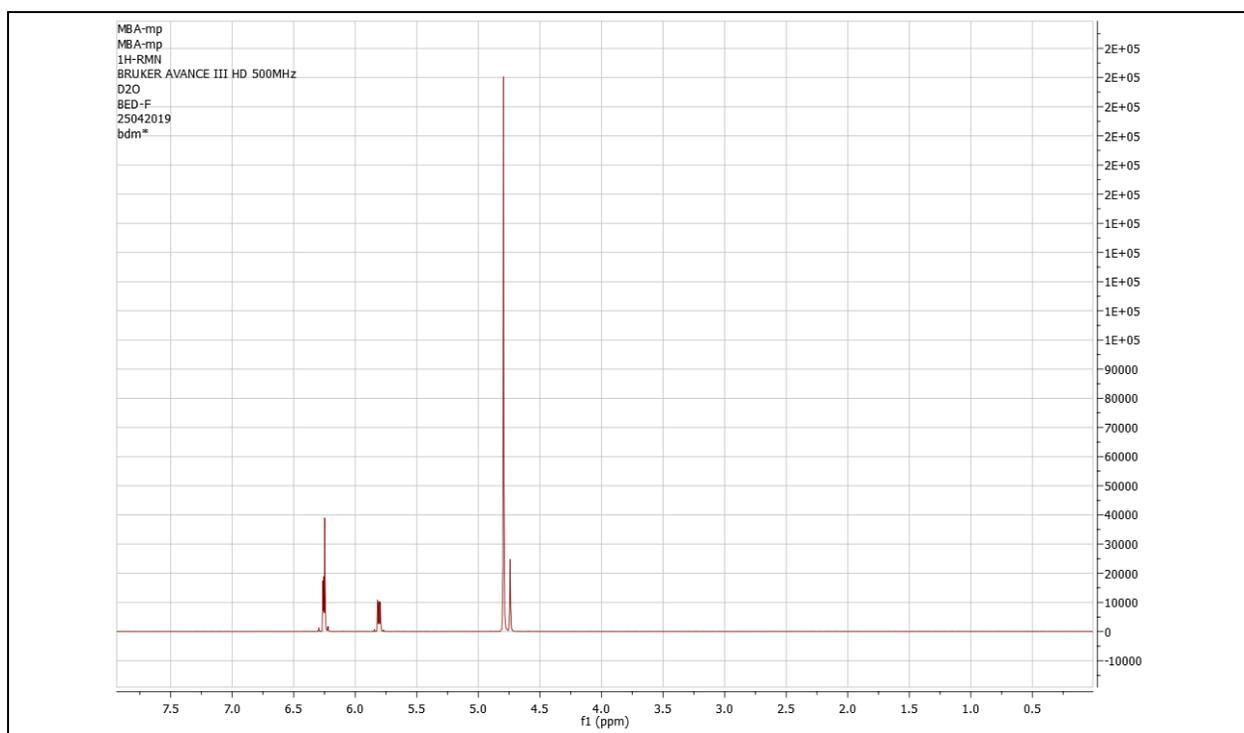


Figura 45. Espectro de protón de NMR para MBA

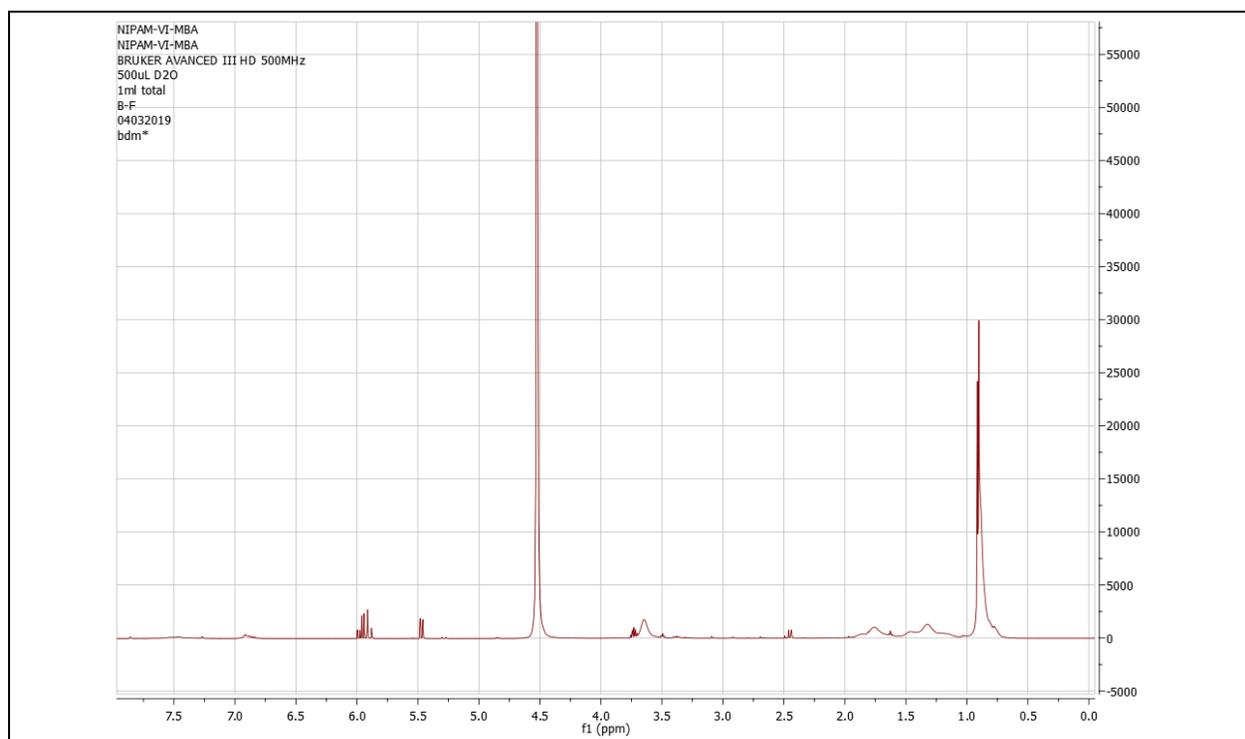


Figura 46. Espectro ^1H NMR para nanogel NV7.52E

En la Figura 44 se muestra el espectro ^1H NMR para el 1VI. En este caso, se observan 3 singuletes en 7.66, 7.20 y 6.98 ppm; cada uno de los cuales corresponde a 1 protón, que se asignan al heterociclo nitrogenado. En 6.84, 5.25 y 4.83 ppm, se presentan 3 dobles de dobles, que integran cada uno para 1 protón y corresponden a los protones del grupo vinílico de la molécula.

En la figura 45 está el espectro ^1H NMR de la MBA. En 6.3 ppm se encuentra un singulete desplazado que integra para el protón de la amina secundaria. Así mismo, en 6.25 6.20 y 5.80 ppm se aprecian los 3 dobles de dobles que integran cada uno para el protón del doble enlace.

En la Figura 46, se muestra el espectro ^1H NMR del nanogel NV7.52E. En este espectro se observan señales que indican la formación de un gel. En primera instancia, aparecen dos multipletes de complejidad alta entre 1.25 y 2.0 ppm, que corresponden a los protones alifáticos, como producto de la polimerización del doble enlace en la NIPAM. Además, se muestra el engrosamiento de las señales en 1.16 ppm del grupo isopropilo. Finalmente, se aprecia que el protón del metino pasa de ser un heptuplete a ser una señal completa a campo más alto, lo que indica que su entorno magnético ha cambiado, por efecto de las cadenas poliméricas. Es difícil visualizar señales de las demás materias primas, pues la proporción empleada es muy pequeña en comparación a la de la NIPAM.

6.2.5 Obtención del peso molecular aparente del nanogel mediante DLS

El peso molecular de los nanogeles es muy poco reportado, debido a la dificultad que representa medirlo en una sola partícula aislada. Por esta razón muchos autores prefieren estudiar su contenido de agua o su concentración.²²

Es posible calcular un peso molecular aparente con base a técnicas de DLS y SLS. En estas determinaciones se utilizan concentraciones crecientes de una muestra para construir una curva de *Debye*. En las Figuras 47 y Tabla 21, se presenta la curva de *Debye* construida para el nanogel NV7.52E, en la que se emplearon concentraciones entre 0.1 y 0.35 mg/mL.

La recta generada interseca al eje $\frac{Kc}{R\theta}$ en un valor de 0.00789 KDa⁻¹, cuyo inverso es el peso molecular del nanogel, es decir 127.23 KDa. Este valor es pequeño, en comparación con los reportados en la literatura, que son cercanos a 1000 KDa.^{139, 140} La diferencia se debe al método de preparación y al porcentaje de agente entrecruzador empleado.¹⁴¹ Como el nanogel obtenido se preparó a través de la técnica de polimerización por precipitación, la cantidad de monómero adicionado en las estructuras formadas estuvo limitada por la estabilidad electrostática. Además, que al utilizar bajas cantidades de entrecruzador, la densidad de cadenas poliméricas en la estructura del nanogel fue pequeña.

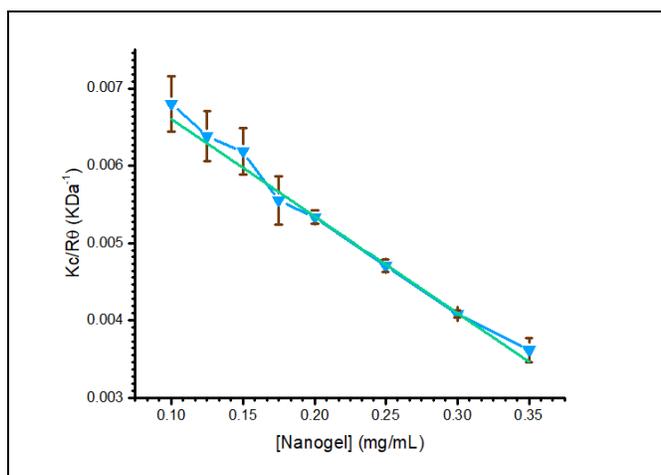


Figura 47. Curva de *Debye* linealizada para la obtención del peso molecular aparente del nanogel NV7.5 2E

Tabla 21. Ecuación y parámetros de linealización de la curva de *Debye* para nanogel NV7.5 2E

$\frac{[Kc]}{R\theta} = -0.01256 \frac{mL}{mg} [Nanogel] + 0.00786 KDa^{-1}$	
Intercepto	$0.00786 \pm 1.1 \times 10^{-4} KDa^{-1}$
Pendiente	$-0.01256 \pm 4.2 \times 10^{-4} mL/mg$
R^2	0.99347

6.2.6 Estudio de la morfología y el tamaño de partícula del nanogel a través de SEM

Para verificar el tamaño de partícula del nanogel y observar su forma, se obtuvieron imágenes con SEM. La observación de muestras coloidales mediante técnicas de microscopía electrónica no es tan trivial, dado que su preparación implica un proceso de secado, ya que las moléculas de agua interfieren en las condiciones de vacío necesarias para

la obtención de imágenes.¹⁴² En este tipo de sistemas, el agua es parte fundamental de la estructura e influye en su tamaño y forma; de manera que se necesita preservar si se desean obtener imágenes que revelen sus características reales.

Se han propuesto múltiples métodos para superar esta complicación, tales como: el secado mediante la técnica del punto crítico, en donde el agua se reemplaza con CO_2 ;¹⁴³ o criosem, en donde las muestras se congelan con nitrógeno líquido, mientras se usa una cámara criogénica acoplada al equipo de microscopía en la que se obtienen las imágenes.¹⁴⁴ Desafortunadamente, no se pudo acceder a ninguna de estas técnicas, por lo que se tuvieron que modificar las condiciones en la preparación de las muestras, a modo que no resultaran agresivas para la estructura. Para ello se utilizó un congelamiento con N_2 líquido, seguido de condiciones de secado suaves; es decir, una presión de vacío de 98 mbar y temperatura ambiente. Posteriormente, para mejorar el contraste, se recurrió a un recubrimiento con oro. El uso de delgadas capas de oro es muy utilizado en muestras basadas en átomos de bajo peso molecular, como en el caso del carbono de los polímeros. Esto porque los metales pueden disminuir el ruido obtenido, asociado a la baja capacidad de emisión de electrones de algunos átomos.¹⁴⁵

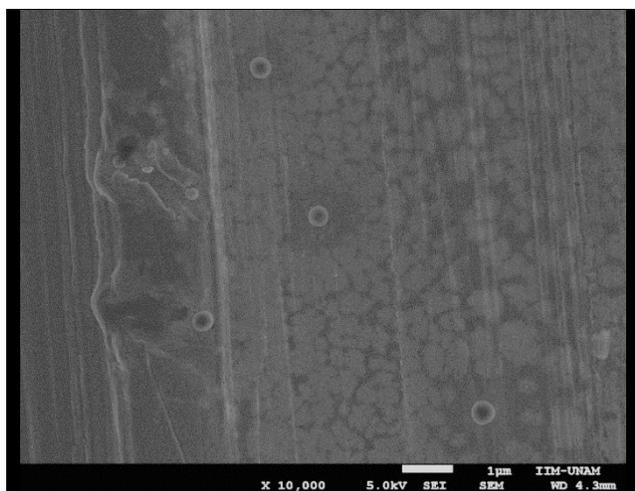


Figura 48. Micrografía SEM que muestra sistemas no polidispersos en nanogel NV7.5 2E a pH 7

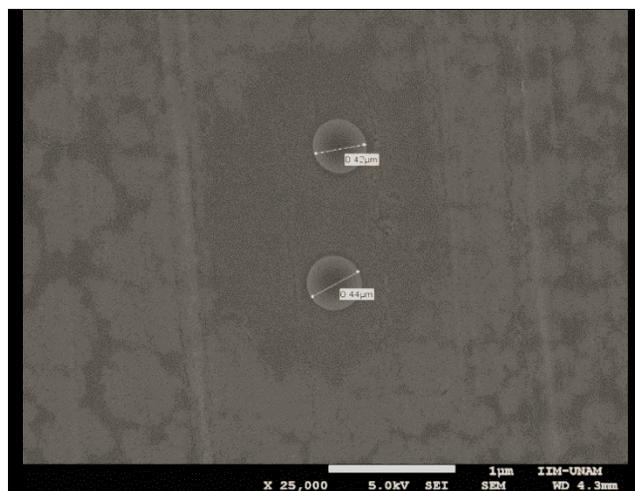


Figura 49. Micrografía SEM que muestra la morfología y tamaño de nanogel NV7.5 2E a pH 7

Para las determinaciones de los nanogel, únicamente se pudieron realizar micrografías al dispersarlos en un medio neutro, porque al utilizar soluciones amortiguadoras a pH 5 (con citratos o acetatos), se obtuvieron imágenes saturadas con los cristales de las sales, que no permitieron detectar las estructuras coloidales. Las micrografías de los nanogel generadas a pH 7 se muestran en las Figuras 48 y 49.

En la Figura 48 se aprecia la homogeneidad de tamaños en las partículas de nanogel, lo cual coincide con el PDI obtenido en DLS. La polidispersabilidad de estos sistemas coloidales

depende, del método de síntesis y las condiciones de reacción, pero también influyen otros aspectos como las proporciones entre los monómeros, así como la cantidad de entrecruzador empleado.¹⁴⁶ En este caso, la monodispersibilidad en los tamaños de partícula puede atribuirse al uso de una moderada cantidad de MBA; un tiempo de polimerización relativamente corto de 16 horas; así como una agitación vigorosa de 300 rpm durante la síntesis.

La micrografía de la Figura 49 muestra que las partículas de nanogel sintetizadas poseen un diámetro entre 400 y 450 nm, utilizando condiciones de pH de 7 y una temperatura de 25°C. Usualmente, sucede que las mediciones obtenidas por DLS suelen ser superiores a las brindadas por SEM, porque la técnica de DLS no tiene la capacidad de diferenciar entre partículas individuales y los aglomerados formados, además de que considera tamaños más grandes, como consecuencia de la interacción de la estructura con el agua.¹⁴⁵

En este caso, el diámetro obtenido por SEM fue ligeramente superior, pero no muy alejado al brindado por DLS. Esto pudo deberse a que las partículas observadas en SEM pertenecen a una población cuyo tamaño es mayor al promedio. Los d_H que arroja DLS son producto de un análisis estadístico que considera todos los tamaños detectados, porque el tamaño de partículas de los coloides sigue una distribución de tipo *Gaussiana*.¹⁴⁷ En este sentido, es importante considerar más de una técnica para reportar el d_H de un sistema, ya que DLS, puede ser engañosa, si no se toman en cuenta las condiciones de dilución adecuadas o si no se evita la aglomeración de los sistemas.

Otra característica que se puede observar en la micrografía es la morfología de las partículas de nanogel, que como se aprecia en la Figura 49, es esférica. La gran mayoría de síntesis de nanogeles dan estructuras de esferas. Esta morfología se debe al mecanismo de formación de las partículas de nanogel. Cuando los iniciadores forman radicales, los monómeros se unen para dar partículas precursoras. La probabilidad de agregación de los monómeros radicalarios con la partícula precursora es igual para cualquiera de sus lados, razón por la cual el crecimiento se da en todos los sentidos, dando como resultado una esfera. En la Figura 48, se aprecia que todas las partículas de nanogel en el campo estudiado presentan forma esférica.

6.2.7 Obtención del pK_a del nanogel a través de titulaciones potenciométricas

Los monómeros ionizables incluidos en macromoléculas como los nanogeles pueden distribuirse tanto en el interior como en el exterior de sus estructuras.^{137, 148} Por esta razón el pK_a de los monómeros en un nanogel puede variar respecto al de la molécula aislada.¹⁴⁹

Para estudiar este fenómeno, se buscó determinar el pK_a real del 1VI en el nanogel, a través de titulaciones potenciométricas en las que previamente se disminuyó el pH de la disolución

a un valor de 5. Esto con el propósito de asegurar que la mayor parte de las especies ionizables accesibles del sistema estuvieran protonadas.

Primero se efectuó una titulación potenciométrica inmediatamente después del ajuste a pH ácido, de modo que se pudiera conocer el efecto de los residuos superficiales del 1VI. En otra determinación, se mantuvo el nanogel a pH 5 durante 3 horas, antes de realizar la titulación. De esta manera, el medio ácido pudo difundir con mayor tiempo dentro de la estructura del nanogel, facilitando la protonación de los átomos de nitrógenos de los 1VI ubicados en su interior.

Dado que el sistema estudiado presenta dos estructuras diferentes que dependen de temperatura, se realizaron las determinaciones a 25°C y 45°C.

Los resultados las curvas potenciométricas inmediata y a las 3 horas a 25°C se observan en las Figuras 50 y 54. En las figuras 51, 52, 55 y 56, se muestran los métodos de la primera y segunda derivada de ΔpH con respecto al volumen de titulante añadido, empleadas para conocer el punto de equivalencia.

En las figuras 50 y 54 no se aprecian puntos de inflexión marcados en el punto de equivalencia. Esto pasa porque el 1VI protonado actúa como ácido débil frente a la base fuerte que se le adiciona, de modo que se necesitó menos NaOH para desprotonar a la especie ácida.

Los métodos de primera y segunda derivada arrojaron gráficamente los puntos de equivalencia de 19.5 y 22 mL para la titulación inmediata y después de las 3 horas, respectivamente. Para conocer el valor del pK_a se usó lo establecido por *Henderson-Hasselbalch* en su ecuación: $pH = pK_a + \frac{[Base\ conjugada]}{[Ácido]}$, calculándose un valor de pK_a de 6.81 para la titulación inmediata y uno de 6.56 para la titulación pasadas las 3 horas.

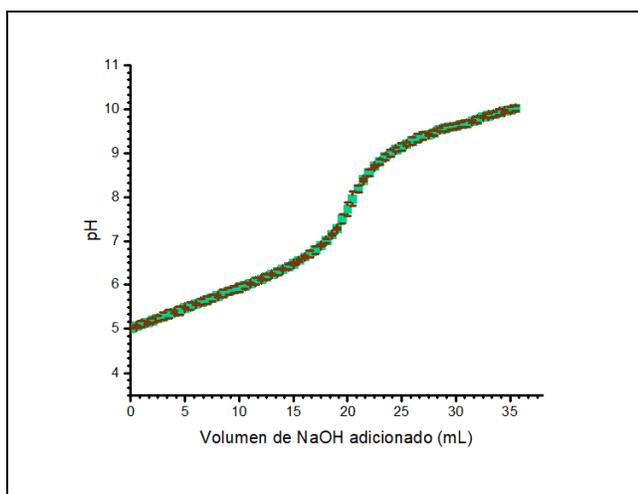


Figura 50. Titulación potenciométrica inmediata para nanogel NV7.5 2E a 25°C

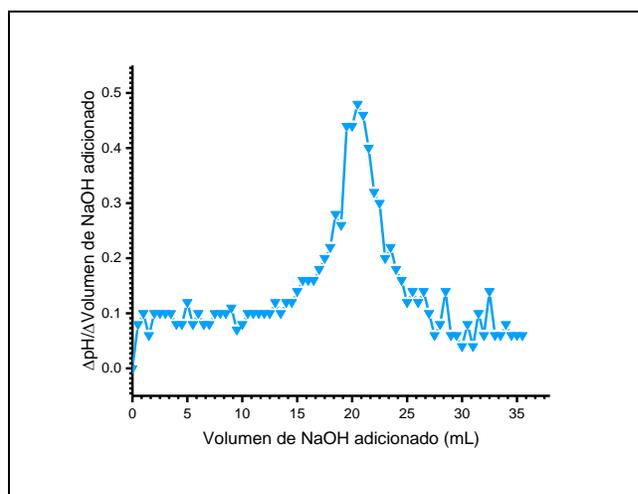


Figura 51. $\Delta pH/\Delta$ Volumen de NaOH adicionado en la titulación inmediata para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C

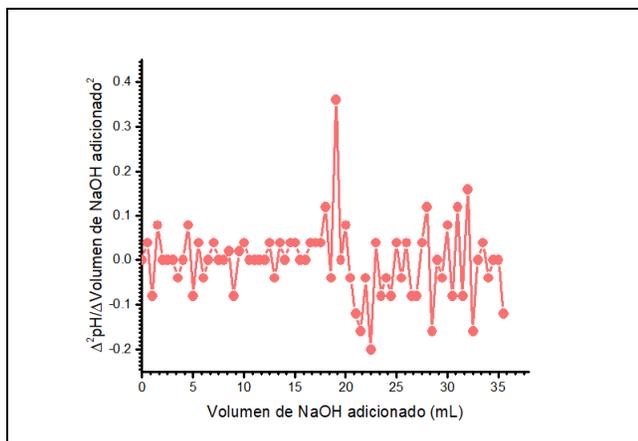


Figura 52. $\Delta^2\text{pH}/\Delta$ Volumen de NaOH de NaOH adicionado² en la titulación potenciométrica inmediata para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C

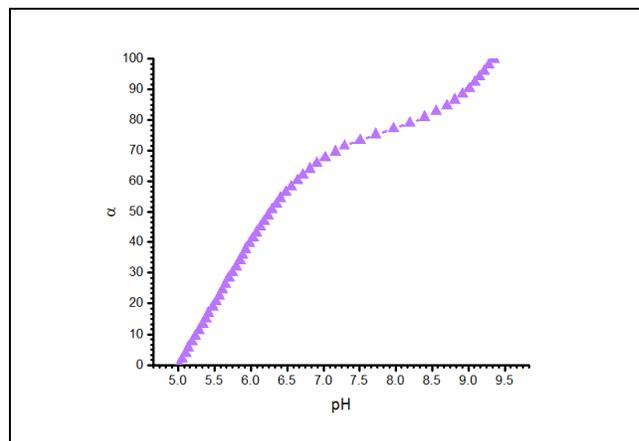


Figura 53. Valor de α con respecto al pH en la titulación potenciométrica inmediata para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C

Para analizar estos datos, se tomó en consideración el grado de disociación (α) obtenido en dichos puntos. El valor de α es la fracción que representa la cantidad de ácido que ha reaccionado con respecto al total.¹⁵⁰ Estos valores se muestran en las Figuras 53 y 57, y son del 64.00% para el nanogel titulado inmediatamente y 58.35% para el titulado 3 horas después. La disminución en la α en la titulación pasadas las 3 horas puede deberse a que los grupos 1VI lograron protonarse durante el tiempo que permanecieron en medio ácido, pero dado que la adición de base en la titulación fue realizada adicionando gota a gota sin dejar transcurrir cierto tiempo, ésta no tuvo la misma facilidad de ingresar dentro de la estructura a través de difusión, de manera que únicamente lograron reaccionar los grupos del 1VI localizados en el exterior de la estructura.

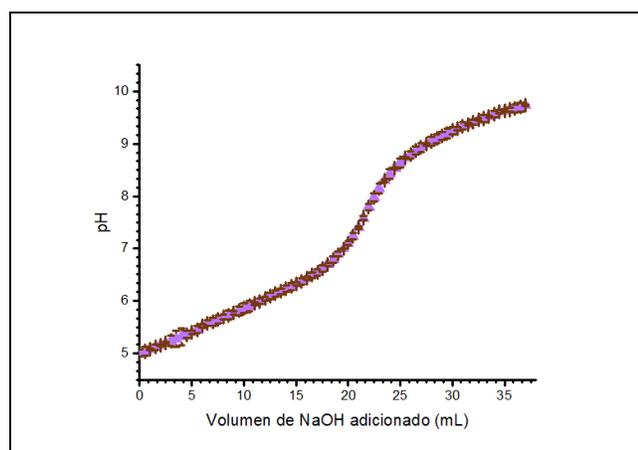


Figura 54. Titulación potenciométrica de 3 horas para nanogel NV7.5 2E a 25°C

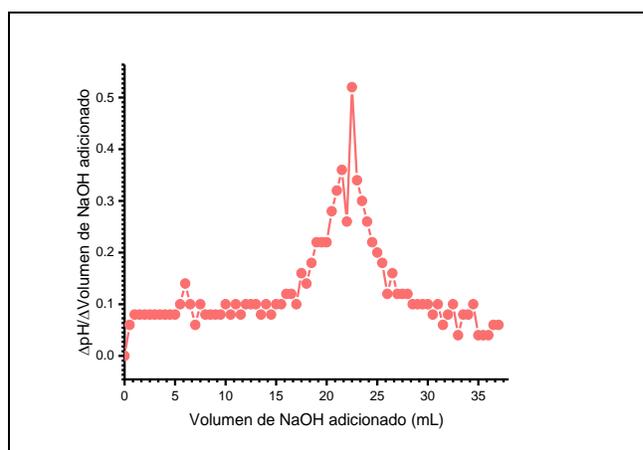


Figura 55. $\Delta\text{pH}/\Delta$ Volumen de NaOH adicionado en la titulación potenciométrica de 3 horas para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C

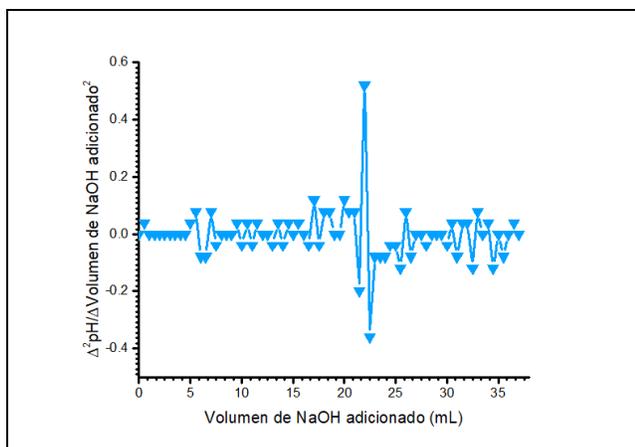


Figura 56. $\Delta^2\text{pH}/\Delta\text{Volumen de NaOH adicionado}^2$ en la titulación potenciométrica de 3 horas para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C

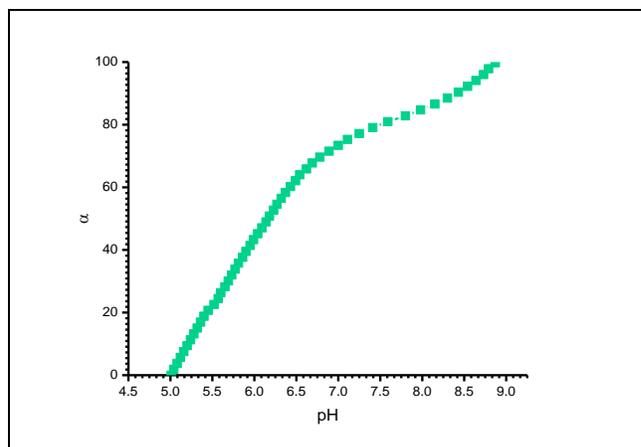


Figura 57. Valor de α con respecto al pH en la titulación potenciométrica de 3 horas para la determinación del pK_a en nanogel NV7.5 2E a 25°C

De este modo, la disminución del pK_a se debió a la contribución de los grupos protonados inaccesibles. Dado que el valor del α en la titulación inmediata fue más grande, se puede pensar que existe una mayor cantidad de grupos de 1VI localizados en la superficie del sistema, sin embargo, no se cuentan con más datos o teorías que puedan precisar el porcentaje.

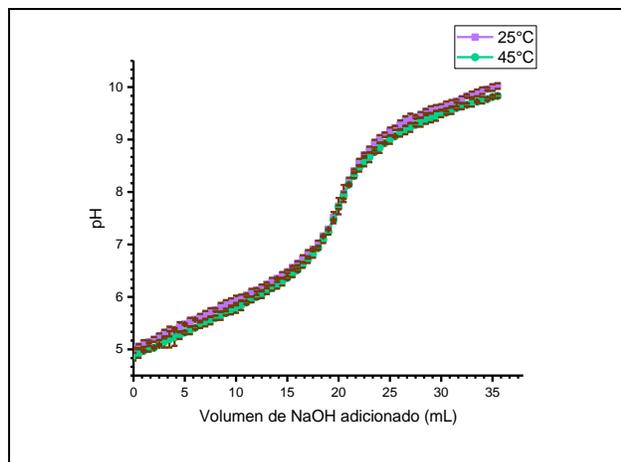


Figura 58. Titulación potenciométrica inmediata para nanogel NV7.5 2E a 45°C

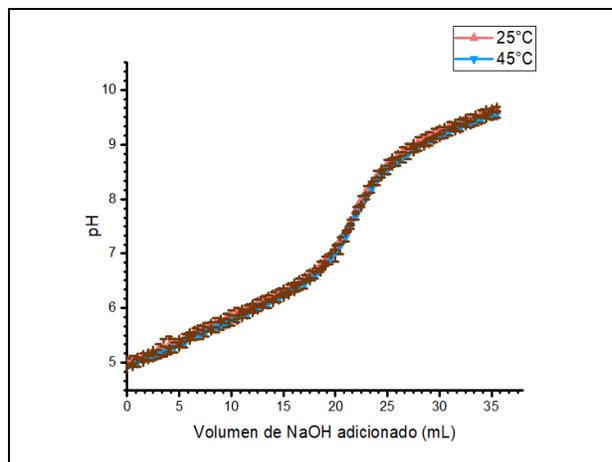


Figura 59. Titulación potenciométrica de 3 horas para nanogel NV7.5 2E a 45°C

Las determinaciones se repitieron con el nanogel colapsado. Los resultados están en las Figuras 58 y 59. En este caso se obtuvo un pK_a de 6.83 para la titulación inmediata y uno de 6.73 para la titulación después de las 3 horas. Aquí se conserva la tendencia de la disminución del pK_a al dejar al sistema en contacto con el medio ácido durante más tiempo.

En la titulación inmediata no existe diferencia significativa en el pK_a , en comparación con el sistema hinchado. Esto quiere decir que independientemente de su colapso, existe una cantidad similar de grupos de 1VI en la superficie. La diferencia estriba en los resultados obtenidos en la titulación después de las 3 horas, dado que el pK_a del nanogel hinchado es menor al del colapsado. Esto puede deberse a que los sistemas colapsados suelen ser menos difundibles, dado que las cadenas poliméricas que los conforman se comprimen al preferir interactuar entre sí. La menor entrada de medio a la estructura provoca que los grupos de 1VI se protonen en menor grado.

Para obtener un pK_a aproximado al real se tomó en cuenta la determinación del nanogel hinchado, puesto que contempla lo que ocurre a temperatura ambiente. Para su cálculo se consideró el promedio de los valores obtenidos en las dos titulaciones.¹⁵¹ Por lo que el pK_a calculado del 1VI en el nanogel fue de 6.67.

6.2.8 Evaluación de la sensibilidad del nanogel a pH por turbidimetría

Se midió a través de técnicas turbidimétricas, la LCST del sistema a pH cercanos al pK_a calculado del 1VI en el nanogel. Los resultados están en las Figuras 60 y 61. En ellas se muestran lo que se esperaba, un aumento en la LCST a medida que se disminuye el pH del medio. Se aprecia que la LCST se incrementa sostenidamente a pH entre 6.8 y 5.5. Esto sucede porque la diferencia con respecto al pK_a real es muy cercana a cero, lo que quiere decir que existe una concentración equivalente entre la especie ácida y su base conjugada. En cambio, cuando el pH del medio es superior al pK_a , la diferencia entre ambos valores es mayor de la unidad, lo que significa que la concentración de especies protonadas se incrementa notablemente, mientras que las desprotonadas tienden a cero. Esto es lo que sucede cuando el pH del medio es de 5. En este punto, se favorece la protonación de los átomos de nitrógenos del 1VI y la LCST aumenta drásticamente. La distribución de especies de acuerdo con la relación entre pH y pK_a se muestra en la Figura 62.

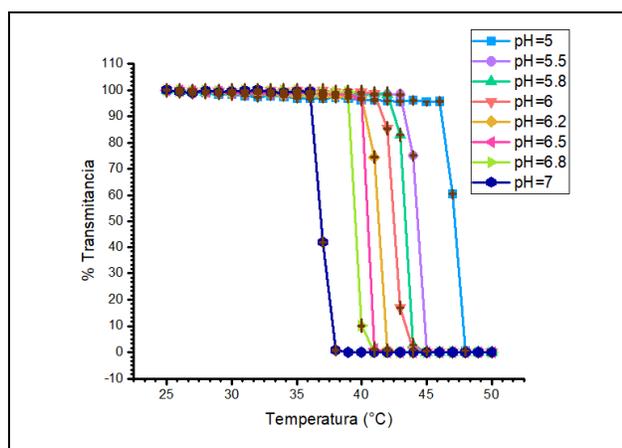


Figura 60. Determinación de LCST de nanogel NV7.5 2E a diferentes valores de pH

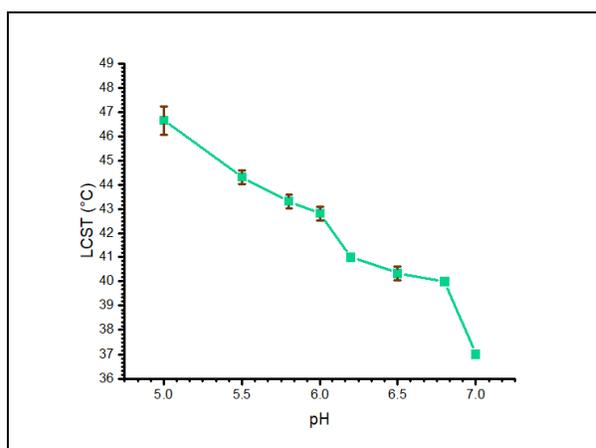


Figura 61. Variación de la LCST con respecto al pH en el nanogel NV7.5 2E

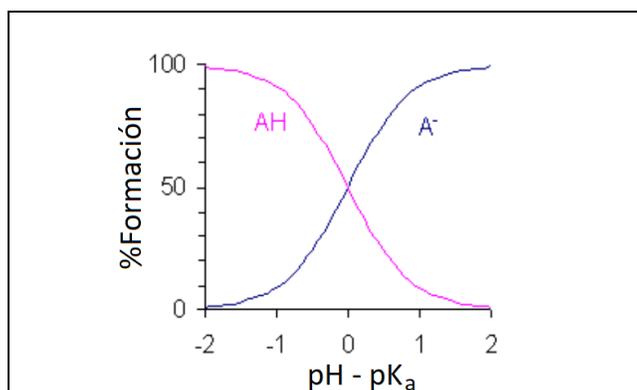


Figura 62. Distribución de formación de especies de acuerdo con la relación entre pH y pKa

6.2.9 Estudios de reología en los nanogel a diferentes temperaturas

El estudio reológico en nanogel sensibles a estímulos es particularmente interesante, puesto que los cambios estructurales que se presentan por el favorecimiento o desfavorecimiento de las interacciones con el disolvente o entre sus cadenas poliméricas, genera fenómenos contrastantes, debido a una alteración en su naturaleza física, que les permite comportarse como partículas suaves o como esferas duras.^{22, 152, 153} Estas variaciones tienen que ver con la alteración en su tamaño y con su grado de entrecruzamiento. En estos experimentos se estudió el efecto de la temperatura en las transiciones de fase del nanogel con las magnitudes reológicas: η , los parámetros G' , G'' y la tangente de pérdida ($\tan\delta$).

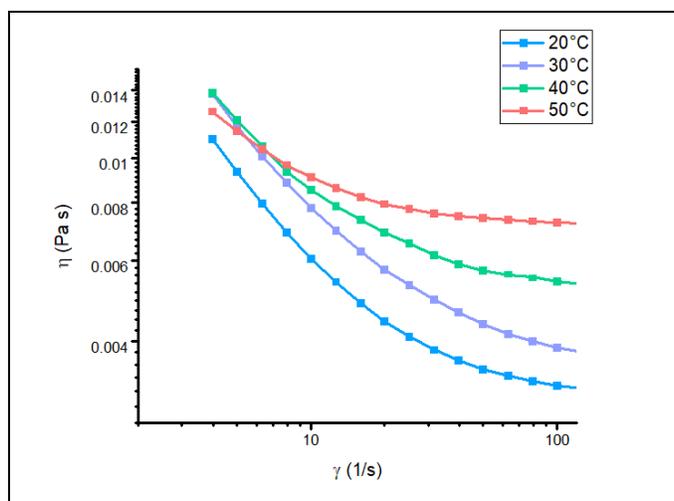


Figura 63. η del nanogel NV7.5 2E a diferentes temperaturas ante la aplicación de una γ

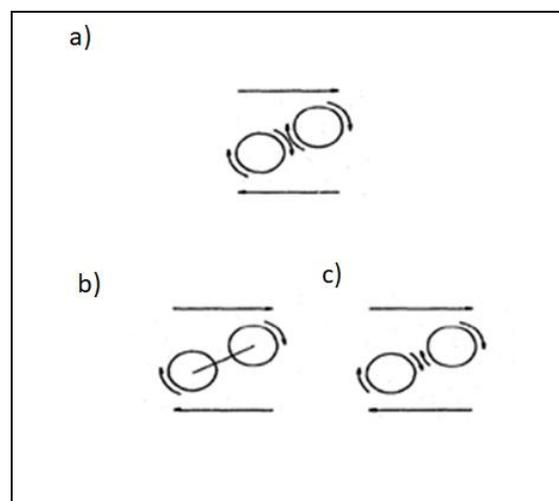


Figura 64. Tipos de rotación presentados en las partículas de nanogel ante la aplicación una ω

Primero se evaluó el efecto de la temperatura en la η de las muestras con la aplicación de una τ concebida como γ , en una prueba de cizalla simple. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 63. Se aprecia que a temperaturas por debajo de la LCST, la viscosidad del nanogel es menor en comparación a temperaturas que superan este valor. En este sentido, cabe señalar que a pH 7 y a temperaturas menores a 36.5°C, los nanogeles tienen una estructura hinchada que aumenta su tamaño, pero al incrementar esta temperatura, las estructuras colapsan, presentando un d_H menor.

La viscosidad se relaciona con la capacidad de empaquetamiento de las partículas, es decir su facilidad para interactuar entre sí al aplicarles una fuerza; aglomerándose en estructuras compactas o paquetes. Cuando las partículas de nanogel están hinchadas, se comportan como esferas suaves, pero al colapsar actúan como esferas duras. Esto implica que a pesar de poseer el mismo grado de entrecruzamiento, los espacios entre las cadenas poliméricas entrecruzadas son mayores en las partículas de nanogel hinchadas, pero cuando colapsan, la densidad de entrecruzamiento se incrementa. De esta manera, cuando la capacidad de empaquetamiento es mayor, el aumento en el grado de compactación en las partículas complica su movimiento, por lo que la viscosidad crece.¹⁵⁴ Por esta razón la viscosidad de los sistemas a 40 y a 50°C fue mayor, en comparación con las presentadas a 20 y 30°C.

Además, en la Figura 63 se aprecia que los nanogeles presentan un comportamiento no *Newtoniano*, tanto en un estado hinchado como en uno colapsado. A diferencia de la mayoría de los líquidos y sólidos que exhiben un comportamiento *Newtoniano*, las dispersiones coloidales frecuentemente presentan viscosidades de tipo no *Newtoniano*.¹⁵⁵ Esto sucede por el efecto impartido por las partículas que componen a los coloides. La presencia de grandes cantidades de partículas de nanogel genera resistencia a la deformación cuando se aplica una fuerza.

Como hay una disminución en el valor de la η conforme la γ se incrementa, se habla que además el nanogel presenta un efecto de adelgazamiento. El fenómeno del adelgazamiento permite la fluidez de los polímeros en disolución. Para poder fluir, los polímeros sufren deformaciones o rearrreglos en su estructura acordes a la intensidad de la fuerza a la que se someten.⁵⁵ En este caso, debido al tamaño de las partículas del nanogel, el efecto de adelgazamiento no se puede atribuir exclusivamente a una alteración en su estructura, siendo el movimiento *Browniano*, el responsable de este fenómeno. Como se aprecia en la Figura 64, la aplicación de una τ sobre una dispersión de esferas coloidales debería provocar su rotación, consecuencia de su propia velocidad angular (64a), sin embargo, debido al movimiento *Browniano*, la distancia de separación de una partícula respecto a otra vecina es mínima, de manera que, para evitar una alta disipación de energía, las esferas cercanas deben girar juntas, en lugar de rotar independientemente (64b). Este movimiento ocurre sobre el centro de masa del conjunto de partículas hasta que la τ aplicada las separa (64c).¹⁵⁶ Esta separación constituye la alteración estructural que da lugar al adelgazamiento.

En otro estudio reológico, se realizó la prueba de cizalla oscilatoria para el nanogel NV7.52E a pH 7, sometiéndolo a temperaturas de 20, 30, 40 y 50°C. Los resultados obtenidos de los módulos G' y G'' se muestran en la Figura 65 y en la Tabla 22. En ellas se aprecia que a temperaturas por debajo de la LCST; G' y G'' tienen una mayor dependencia con respecto a la frecuencia de cizalla aplicada; a diferencia de temperaturas superiores a la LCST, en donde ambos módulos cambian muy poco al aumentar la amplitud de frecuencia. Una alta dependencia de G' y G'' implica que no existe una gran interacción entre las partículas del fluido, mientras que lo contrario sucede cuando los valores de los módulos se asemejan.¹⁵⁷ Esto coincide con lo obtenido en la viscosidad, puesto que, al incrementar la temperatura, las partículas colapsadas que actúan como esferas sólidas, se aglomeran en mayor grado.

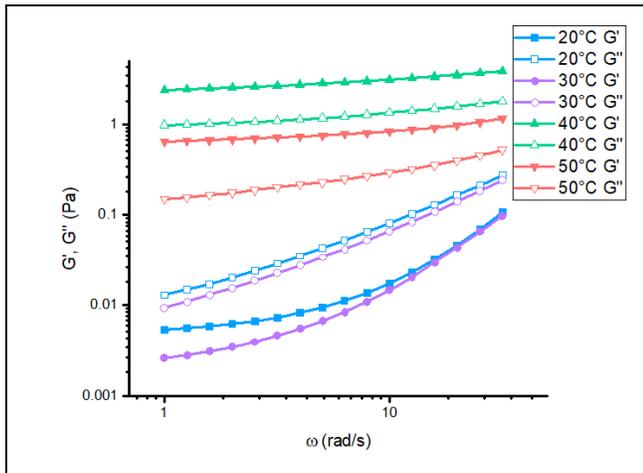


Figura 65. Módulos G' y G'' nanogel NV7.5 2E a diferentes temperaturas ante la aplicación de un ω

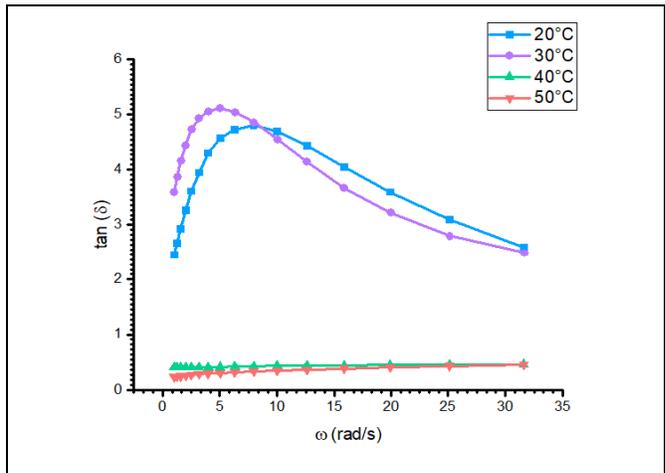


Figura 66. $\tan(\delta)$ a diferentes temperaturas ante la aplicación de un ω

Tabla 22. Comparación entre G' y G'' a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Comparación G' y G''
20	$G' < G''$
30	$G' < G''$
40	$G' > G''$
50	$G' > G''$

En la figura 65 también se aprecia que a 20 y 30°C, el valor de G'' es mayor al de G' . Cuando esto sucede, significa que la energía mecánica que se aplica, se disipa en el medio. Esto se puede atribuir a que la estructura del material se rompe, lo que le permite fluir fácilmente. A estas temperaturas, las partículas de nanogel se encuentran hinchadas, de manera que actúan como esferas blandas, por lo que una fuerza aplicada puede disrumpirlas. El indicio de mayor fluidez a estas temperaturas coincide con los resultados obtenidos en la Figura 64, en los que se les asocia una viscosidad más grande.

Lo contrario ocurre a 40 y 50°C, pues el valor de G' supera al de G'' . Este comportamiento implica que la fuerza aplicada no altera a la estructura de un material, de manera que éste tiene la capacidad de almacenar la energía suministrada. Cuando esto sucede, se dice que los materiales en cuestión son sólidos elásticos. Esta descripción se acopla con lo que le sucede al nanogel a temperaturas elevadas, puesto que la aglomeración de las esferas duras, reológicamente se asemeja a un gel macroscópico. Los comportamientos recabados coinciden con lo reportado en la literatura, en estudios reológicos para materiales termosensibles basados en NIPAM.^{22, 152, 158}

Los resultados descritos anteriormente pueden apreciarse mejor con la relación entre G'' y G' , en la $\tan(\delta)$, un indicador de la fricción interna de un material hacia la fuerza a la que se le somete.¹⁵⁷ Cuando G'' es mayor a G' , el valor de $\tan\delta$, supera a la unidad, lo cual quiere decir que en ella prevalece un carácter viscoso sobre el elástico, mostrando que el fluido se comporta como un líquido. Lo contrario ocurre si G' es superior que G'' , en donde el material actúa como un gel. Por último, si $\tan\delta$ es muy cercano o igual a la unidad, se tratará de un fluido viscoelástico. En la Figura 66, se muestra el comportamiento de $\tan\delta$ del nanogel NV7.52E a diferentes temperaturas. Los datos que se muestran coinciden con el análisis reológico antes mencionado. A temperaturas por debajo de la LSCT se tiene un líquido que fluye, pero por arriba de esta temperatura, la muestra gelifica.

6.3 Adsorción de HA en partículas de nanogel

Para lograr que el nanogel generado fuera direccionado preferentemente hacia los sitios de inflamación, se incluyó un recubrimiento basado en HA, a fin de generar una vectorización activa.

El HA es un polisacárido lineal de origen natural que se conforma por unidades repetidas de un disacárido formado por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. La masa molecular del HA varía, encontrándose usualmente en el orden de 10^6 y 10^7 Da. Usualmente, por cuestiones de solubilidad, se suele utilizar la sal sódica del HA.

Este polisacárido juega un papel importante en el organismo ya que mantiene la viscoelasticidad de los tejidos conectivos, siendo un componente importante del fluido sinovial de las articulaciones y del humor vítreo.¹⁶⁶ Debido a su versatilidad biológica, así como a sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, y de su no-antigenicidad, podría facilitar la permanencia del nanogel en la circulación sanguínea, al evadir su eliminación a través del sistema fagocítico mononuclear, antes llamado sistema retículo-endotelial (MPS, por sus siglas en inglés por *Mononuclear Phagocytic System*).

Para el recubrimiento del nanogel NV7.52E no es viable la inclusión del HA mediante enlaces químicos, dado que ningún componente en el sistema presenta grupos funcionales capaces de formarlos a un rendimiento alto. Por ejemplo, la NIPAM, únicamente cuenta con amidas secundarias, las cuales poseen un bajo grado de reactividad, razón por la cual el número de artículos reportados en los que intenten modificarlas es prácticamente nulo. En el caso del

1VI y el MBA, tampoco resulta buena idea, dado que su proporción en el sistema es baja. Es por ello, que la inclusión del HA en el nanogel se hizo a través de adsorciones físicas, en las que se aprovecharon las interacciones electrostáticas entre los grupos de los componentes implicados.

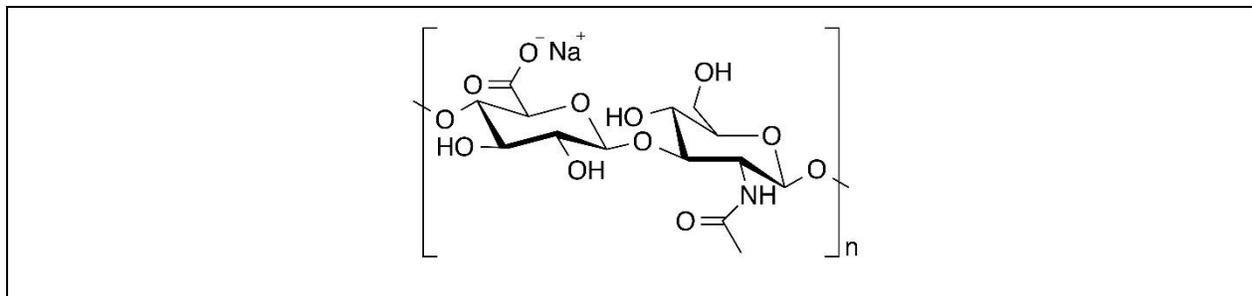


Figura 67. Estructura molecular del HA sódico

Un problema por superar fue la cuantificación del HA, puesto que como se ve en la Figura 67, su estructura química no presenta grupos cromóforos que permitan su medición directa a través de métodos espectroscópicos. Los métodos de cuantificación reportados en la literatura son ensayos con carbazol o bromuro de cetiltrimetilamonio,¹⁶⁶ así como su digestión enzimática;¹⁶⁷ sin embargo, todos son extremadamente laboriosos, tardados y muy poco sensibles, además que en algunas ocasiones implican el uso de HPLC y algunas técnicas de espectroscopía de masas. Dado que no se contó con este tipo de reactivos, ni equipo, se procedió a realizar la cuantificación del HA, mediante técnicas físicas, tales como la medición de tamaño de partícula con DLS, el peso molecular con DLS y SLD y un estudio de densidades.

6.3.1 Obtención del tamaño de partícula de nanogel recubierto a través de DLS

Para verificar la adsorción del HA en las partículas de nanogel en los diferentes tratamientos, se midió el d_H de la muestra centrifugada y se compararon los tamaños obtenidos con el del nanogel sin recubrimiento. Estas mediciones se hicieron ajustando el pH a 7 y a una temperatura de 25°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 23 y en la Figura 68. En ellos se aprecia que a medida que se aumentó la cantidad de HA adicionado, se incrementó el d_H del sistema, lo cual es indicio de que éste sí llegó a recubrir a las partículas de nanogel. El ANOVA se presenta en el Anexo 11 y muestra que con un 95% de confianza hay diferencia significativa en el efecto generado por las [HA] usadas.

Como se puede observar, se utilizaron cantidades muy pequeñas de HA en comparación a lo que se añadió de nanogel. Esto debido a que, según el proveedor, el peso molecular del HA con el que se cuenta está entre 1.5 y 1.8×10^6 Da.

Tabla 23. Variación del d_H y PDI de nanogel NV7.5 2E al recubrirlos con distintas cantidades de HA

[HA] (mg/mL)	d_H (nm)	PDI
0.1	593.57	0.457
0.25	1358.33	0.576
0.4	2370.00	0.687
0.5	3016.00	0.448
1	3755.67	0.612
1.5	5930.67	0.613

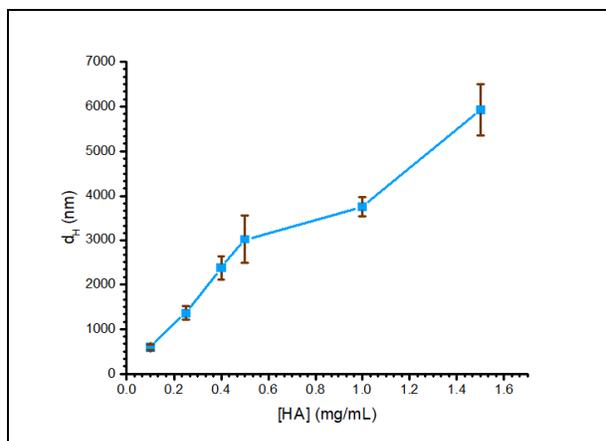


Figura 68. Incremento del d_H a medida que se aumenta la cantidad de HA en el recubrimiento

En los resultados se aprecia que las cantidades más altas de HA usadas, fueron capaces de aumentar el tamaño del sistema hasta más de 5 μm , lo cual resulta desfavorable para lo que se busca. Por esta razón, se decidió utilizar la menor cantidad de polisacárido, que en ese caso fue de 0.05 mg. Con este tratamiento, la partícula de nanogel incrementó su tamaño alrededor de 250 nm, pasando de un d_H de 315.8 a 593.6 nm.

En cuanto al PDI de los sistemas, igualmente se aprecia que su valor aumentó a medida que se incrementó la cantidad de HA utilizado. El incremento es considerable, de modo que al utilizar más de 0.5 mg de HA, el PDI llegó a ser superior a 0.5, por lo que, la muestra dejó de ser monodispersa. Esto se puede explicar porque cuando está en disolución acuosa, el HA forma estructuras secundarias para estabilizarse, pudiendo llegar a formar conglomerados de hasta 200 nm.¹⁶⁵ De esta manera, cuando se utilizaron mayores cantidades de HA, no se obtuvieron únicamente partículas de nanogel recubiertas, sino también se incrementó la cantidad de estructuras de HA. El tratamiento con el que se obtuvo menor PDI fue en donde se utilizó 0.5 mg de HA. El ANOVA realizado se encuentra en el Anexo 12.

Con estos datos se decidió utilizar 0.5 mg de HA para recubrir el nanogel, dado que fue la formulación que arrojó menor tamaño de partícula y PDI.

6.3.2 Estudio de morfología y tamaño de partícula del nanogel recubierto a través de SEM

Una forma de verificar que lo que se midió a través de DLS son las partículas de nanogel recubiertas con HA; y no las estructuras secundarias del HA o esferas de nanogel incluidos en grandes estructuras de HA, es a través de SEM.

Para la preparación de la muestra, se colocó una pequeña gota del centrifugado en la cinta metálica y se dejó secar al vacío. En este caso, a diferencia del nanogel sin recubrir, no se

utilizó N_2 líquido, sin embargo, sí se pudieron observar sin problema a los sistemas, por lo que se deduce que el HA le confiere cierta estabilidad al nanogel.

Las micrografías obtenidas, se muestran en las Figuras 69 y 70. Primeramente, se aprecia en la Figura 69, que a diferencia del nanogel sin recubrir, éstos presentan una forma no tan esférica y difusa, lo cual se puede atribuir a la inclusión de las cadenas del polisacárido adsorbidas. Además, las micrografías muestran diferencias en la topografía, puesto que hay sitios en donde existe mayor cantidad de HA que en otros. La heterogeneidad en la superficie de la partícula se aprecia mejor con el efecto que da la cubierta de oro añadida para mejorar el contraste, pues se logran apreciar zonas en donde se aglomera más cantidad de este metal.

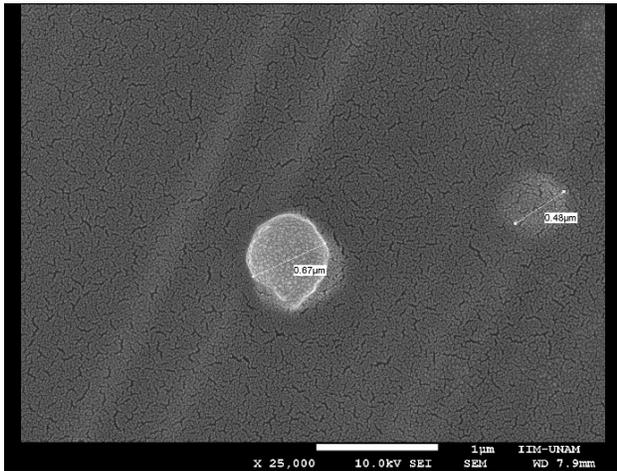


Figura 69. Micrografía SEM que muestra partículas de nanogel NV7.5 2E recubiertas con HA

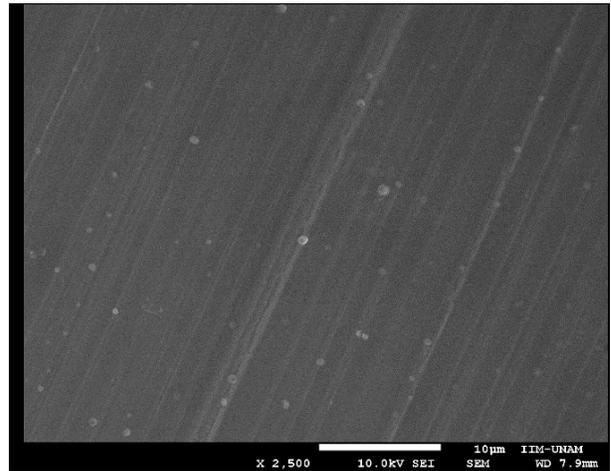


Figura 70. Micrografía SEM que muestra la monodispersabilidad en tamaño y forma de los nanogel 7.5 2E recubiertos

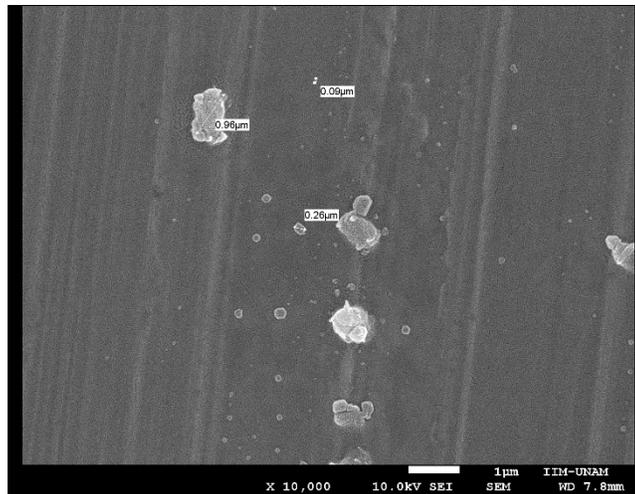


Figura 71. Micrografía SEM que muestra el sobrenadante separado del proceso de centrifugación de los nanogel NV7.5 2E recubiertos con HA

Estas imágenes también permitieron estudiar el tamaño de los nanogeles. Las micrografías muestran que los sistemas recubiertos tienen un d_H entre los 430 y 650 nm, lo cual coincide con el que muestra DLS.

En la Figura 70, se puede observar que el grado de monodispersión en los tamaños y en las formas de los sistemas no fue tan bajo como en el caso del nanogel sin recubrir, sin embargo, contrastándolo con el PDI obtenido en DLS, éste aún muestra valores aceptables.

Se obtuvo una micrografía SEM del sobrenadante de la centrifugación del sistema de nanogel con HA. Esta imagen se muestra en la Figura 71. Se obtuvieron dos tipos de sistemas. Por una parte, se tienen partículas esféricas muy pequeñas, cuyo tamaño oscila entre los 100 y 200 nm. La forma esférica en este tipo de material no es tan definida, de manera estos sistemas no son nanogel y posiblemente sean fragmentos pequeños de HA, pues el tamaño coincide con la forma de las estructuras secundarias que anteriormente se comentaban. Por otro lado, hay sistemas más grandes sin forma definida, que pueden ser aglomerados de estos fragmentos de HA. En este sentido, no sería sorprendente tener este tipo de sistemas grandes, dado que no existe ningún mecanismo para controlar su tamaño y su forma. Estas imágenes comprueban, que el método de centrifugación utilizado, es ideal para separar las partículas de nanogel recubiertas del excedente de HA que se adiciona, dado que las micrografías del botón obtenido no muestran este tipo de estructuras.

6.3.3 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA mediante la obtención de densidades

Para conocer la cantidad de HA en el nanogel se realizaron ensayos de densidad, a través de una balanza de *Mohr-Westphal*, un dispositivo basado en el principio de *Arquímedes*, que relaciona la densidad de un fluido con la fuerza de empuje que tiene un objeto al ser sumergido en él. En estas determinaciones, se correlacionó la masa del HA (m_{HA}) con la densidad de disoluciones acuosas (ρ_{HA} en disolución acuosa) de este polisacárido.

Tabla 24. Obtención de f a partir de la σ' calculada

Repetición	ρ' (mg/mL)	f
1	0.650	1.534
2	0.654	1.524
3	0.653	1.527
Promedio	0.652	1.528

Figura 72. Curva de calibración de la masa de HA y su densidad en una disolución acuosa

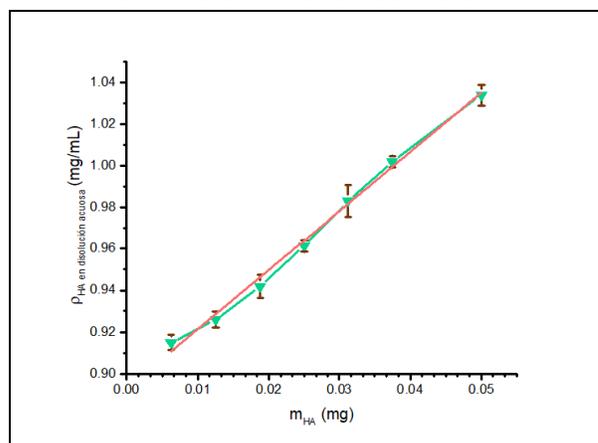


Tabla 25. Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de la masa de HA y su densidad en una disolución acuosa

$\rho_{HA \text{ en disolución acuosa}} = 2.8395 \text{ mg}^{-1}(m_{HA}) + 0.8926 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$	
Intercepto	0.8926 mg/mL
Pendiente	2.8395 mg^{-1}
R ²	0.9945

Para la calibración del equipo se utilizó el valor de la densidad del agua destilada a 26°C. Para ello se obtuvo un factor de conversión (f), a través de la relación entre su densidad experimental (ρ') y la densidad conocida (ρ) de 0.99688 mg/mL, como se indica:

$$f = \frac{\rho}{\rho'}$$

En la Tabla 24 se muestran los valores de la ρ' del agua, que arrojaron una f de 1.528, empleado para la construcción de la curva de calibración mostrada en la Figura 72 y Tabla 25.

Para calcular el valor de la densidad medida del sobrenadante del centrifugado ($\rho_{HA \text{ libre}}$), se multiplicó la medición obtenida por f. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Valores obtenidos de la determinación de $\rho_{HA \text{ libre}}$

Repetición	$\rho_{HA \text{ libre}}$ (mg/mL)
1	0.9290
2	0.9321
3	0.9275
Promedio	0.9295

El promedio de la $\rho_{HA \text{ libre}}$ se interpoló en la curva de calibración, obteniéndose una $m_{HA \text{ libre}}$ promedio de 0.0130 mg, según el cálculo mostrado a continuación:

$$\rho_{HA \text{ en disolución acuosa}} = \rho_{HA \text{ libre}}$$

$$\rho_{HA \text{ libre}} = 2.8395 \text{ mL}^{-1} (m_{HA \text{ libre}}) + 0.8926 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

$$m_{HA \text{ libre}} = \frac{\rho_{HA \text{ libre}} - 0.8926 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{2.8395 \text{ mL}^{-1}} = \frac{0.9295 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} - 0.8926 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{2.8395 \text{ mL}^{-1}}$$

$$m_{HA \text{ libre}} = 0.0130 \text{ mg}$$

Considerando que la masa total de HA ($m_{HA \text{ total}}$) adicionada al nanogel fue de 0.05 mg, la diferencia con la $m_{HA \text{ libre}}$, resulta en la masa de HA unida al total de nanogel ($m_{HA \text{ unido}}$), tal como se muestra:

$$m_{HA\ total} = m_{HA\ unido} + m_{HA\ libre}$$

$$m_{HA\ unido} = 0.05\ mg - 0.0130\ mg$$

$$m_{HA\ unido} = 0.037\ mg$$

De este modo, la adsorción del 0.05 mg de HA a 10 mg de nanogel, permitieron la unión de 0.037 mg del polisacárido, lo cual equivale a un rendimiento del 74.0%, que son buenos, dado que el HA libre se puede recuperar centrifugando.

6.3.4 Determinación de la cantidad de recubrimiento de HA mediante peso molecular aparente por DLS y SLS

Para conocer la cantidad de HA que recubre a cada partícula de nanogel se determinó su peso molecular aparente a través de DLS y SLS, siguiendo el mismo método utilizado para el nanogel sin recubrir.

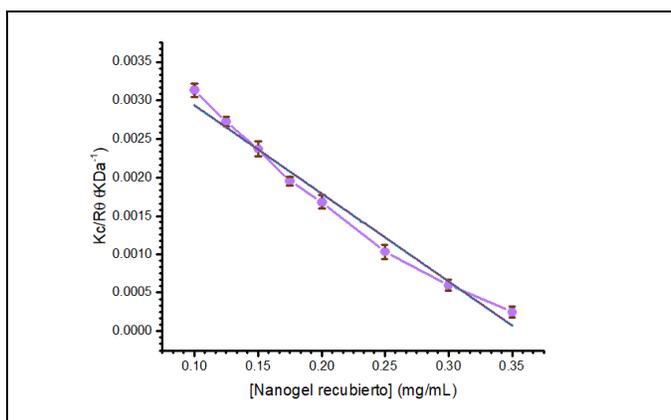


Tabla 27. Ecuación y parámetros de linealización de la curva de Debye para nanogel NV7.5 2E recubierto

$\frac{[Kc]}{R\theta} = -0.01146 \frac{mL}{mg} [Nanogel\ recubierto] + 0.00408\ KDa^{-1}$	
Intercepto	0.00408 KDa ⁻¹
Pendiente	-0.01146 mL/mg
R ²	0.9796

Figura 73. Curva de Debye linealizada para la obtención del peso molecular aparente del nanogel NV7.5 2E recubierto

Se construyó una curva de Debye, usando concentraciones entre 0.1 y 0.35 mg/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 73 y Tabla 27. De la gráfica generada, se obtuvo un intercepto de 0.0039 KDa⁻¹, cuyo inverso es de 245.10 KDa, que equivale al peso aparente del nanogel recubierto. De la determinación realizada al nanogel sin recubrir, se sabe que tiene un molecular aparente de 126.6 KDa. Esto arroja una diferencia de 117.87 KDa, que equivalen al peso molecular del fragmento de HA que recubre a cada partícula de nanogel, como se aprecia a continuación:

$$PM_{Nanogel\ recubierto} = PM_{Partícula\ nanogel} + PM_{Recubrimiento\ HA}$$

$$PM_{Recubrimiento\ HA} = PM_{Nanogel\ recubierto} - PM_{Partícula\ nanogel}$$

$$= 245.10\ KDa - 127.23\ KDa$$

$$PM_{Recubrimiento\ HA} = 117.87\ KDa$$

El HA en el nanogel constituye una plataforma para incluir MTX. En este caso, el alto peso molecular del sistema no sería impedimento para que pueda permanecer la circulación sistémica, dado que el HA de alto peso molecular es una sustancia endógena.¹⁶⁵

6.3.5 Determinación de la LCST del nanogel recubierto a diferentes pH mediante turbidimetría

Una vez que se ha conseguido recubrir los nanogel con HA, es necesario verificar que se conserven las características físicas que permitan el sistema farmacéutico buscado. En este sentido, una de las propiedades primordiales es su sensibilidad y reacción ante estímulos de pH y temperatura. Por esta razón, se determinó la LCST del nanogel recubierto a pH 5 y 7 mediante turbidimetría, tal como se hizo con el sistema sin HA. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 74 y 75 y en la Tabla 28.

En estas gráficas se muestra que se conserva la LCST del sistema, es decir: 43°C para pH de 5; y 36.5°C para pH de 7. La razón por la que no existe alteración en la LCST del sistema es porque la inclusión del HA se hizo a través de interacciones físicas, que no comprometieron ni alteraron la estructura ya lograda en el nanogel. Como resultado no existió alteración en su balance hidrofílico e hidrofóbico, ni en la capacidad de formar puentes de hidrógeno o las interacciones entre las mismas cadenas poliméricas, así como tampoco modificó las contribuciones entrópicas del sistema.

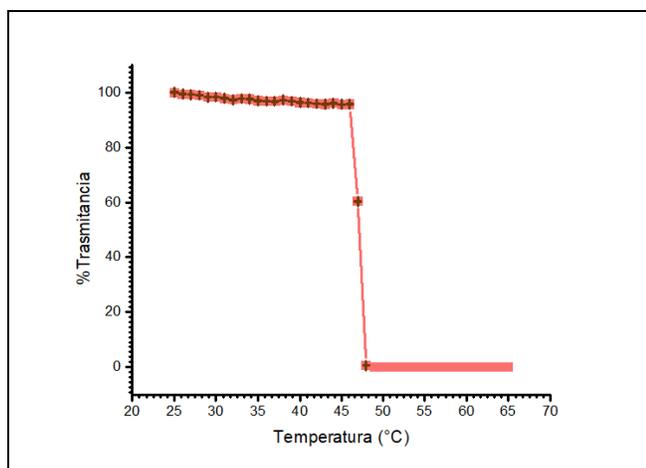


Figura 74. Determinación de LCST a pH de 5 en nanogel NV7.5 2E recubierto

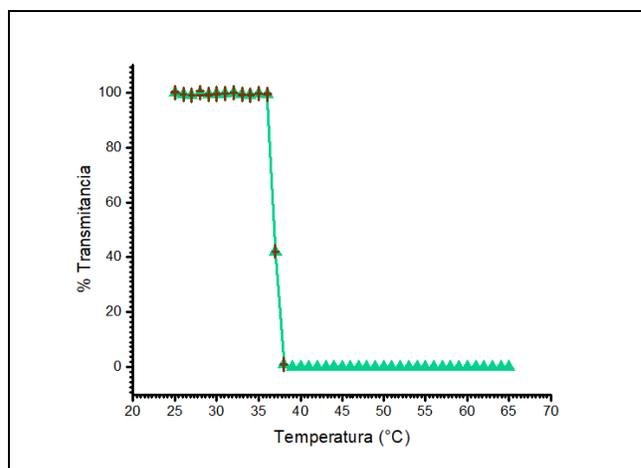


Figura 75. Determinación de LCST a pH de 7 en nanogel NV7.5 2E recubierto

Tabla 28. LCST a pH 5 y 7 del nanogel 7.5 2E recubierto

Formulación	LCST (°C)	
	pH=5	pH=7
NV7.5 2E recubierto	43	36.5

Por otro lado, estos datos indican que la permeación del medio a través del HA es buena. Si el recubrimiento de HA fuera muy denso y compacto, la entrada del disolvente en el nanogel sería lento lo que podría provocar que el punto de inflexión de la LCST no fuera tan definido. En este sentido, no existe cambio alguno entre ambos perfiles.

La estructura primaria del HA, se conforma por unidades repetidas de D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, los cuales poseen una numerosa cantidad de grupos hidroxilo, carbonilos y amidas, capaces de formar hasta 5 puentes de hidrógenos con unidades vecinas.¹⁶⁸ Esta interacción provoca la formación de una estructura secundaria de doble hélice,¹⁶⁹ que es laxa,¹⁶⁸ por lo que no dificulta la entrada de agua a través de ella.

6.3.6 Determinación del tamaño del nanogel recubierto a diferentes pH mediante DLS

Para un mejor estudio de este sistema, se evaluó su d_H a pH 5 y 7. Los resultados obtenidos, comparándolos con el nanogel sin recubrir, se muestran en la Tabla 29. Con base a la LCST obtenida con turbidimetría, no se esperaba diferencias en el comportamiento de hinchamiento y colapso de los sistemas.

Evidentemente, dado que el recubrimiento con HA, aumentó el tamaño del sistema, se justifica el aumento en los tamaños de las partículas de nanogel para ambos estados. Se puede observar que, para todos los casos, la diferencia en el tamaño con respecto a las esferas sin recubrimiento oscila entre los 220 y 277 nm, que se asocia a la contribución del HA. En este sentido, no existe una relación directa con el pH del medio ni con el estado hinchado o colapsado del nanogel. Esto porque, el HA no es sensible a esos rangos de pH ni a la temperatura, de manera que no debe presentar cambios en su estructura al variar estas condiciones.

Tabla 29. Comparación entre d_H calculados por DLS de nanogel 7.5 2E sin y con recubrimiento

pH	Sin recubrimiento		Con recubrimiento		Diferencia	
	Hinchado	Colapsado	Hinchado	Colapsado	Hinchado	Colapsado
5	451.5	173.4	672.1	439.2	220.6	265.8
7	315.8	99.6	593.5	350.5	277.7	250.9

El recubrimiento de HA implicó un aumento en el tamaño de partícula del sistema, sin embargo, no sería obstáculo para poder ser administrado o para biodistribuirse por circulación sistémica. En primera instancia, su tamaño es ideal para circular a través de los vasos sanguíneos sin ocasionar trombosis. En ese sentido, hay que considerar que el diámetro promedio de éstos oscila entre 1 y 5 μm .¹³⁸ Por otro lado, el tamaño del sistema colapsado es menor al de los poros de las fenestraciones del *pannus*, que es alrededor de 600 nm,⁹⁰ lo cual le permitiría ingresar con facilidad a estas zonas; pero al mismo tiempo, se dificultaría su acceso a través de capilares sanguíneos sanos, con poros que miden cerca

de 90 nm.¹³⁸ Finalmente, el hinchamiento del nanogel propiciaría a su permanencia en los sitios inflamados, mediante mecanismos de vectorización pasiva.

6.3.7 Obtención del pK_a del nanogel recubierto a través de potenciometría

Para conocer la influencia del HA en el pK_a del sistema, se realizó una titulación convencional. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 76 y Tabla 30.

Durante la determinación, el nanogel recubierto siempre estuvo desprotonado, debido a que el pK_a del HA es de 2.9.¹⁷⁰ Por esta razón no se alteró el valor del pK_a del sistema y se mantuvo su sensibilidad al pH.

La presencia del HA no afectará el desempeño biológico del sistema, dado que a condiciones fisiológicas nunca se llegará a un pH en el que el HA se encuentre protonado.

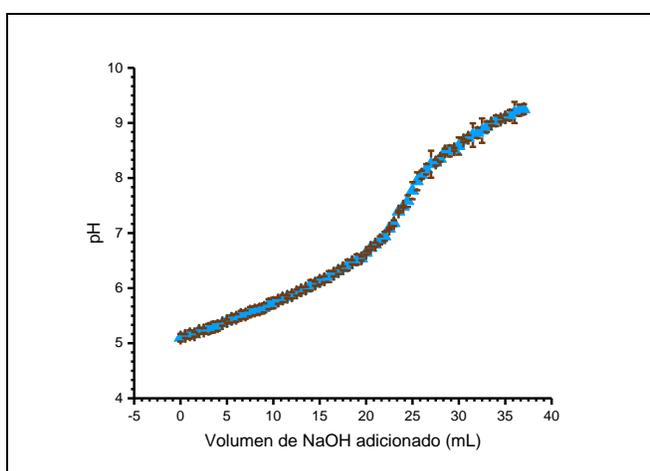


Tabla 30. Comparación ente pKa de nanogel NV7.5 2E sin y con recubrimiento

	Sin recubrimiento	Con recubrimiento
pK _a	6.82	6.43

Figura 76. Curva de *Debye* linealizada para la obtención del peso molecular aparente del nanogel NV7.5 2E

6.4 Inclusión de MTX en partículas de nanogel recubiertas con HA

La gran capacidad del MTX para formar puentes de hidrógeno, resultó benéfico en su proceso de adsorción, dado que el nanogel recubierto posee numerosos grupos hidroxilo, ácidos carboxílicos y amidas, que están presentes en el HA que contiene.

Para el proceso de adsorción únicamente se consideró al nanogel en su forma hinchada, de manera que se favorecieron las interacciones entre el sistema hidrofílico y los puentes de hidrógeno que puede formar el MTX. Esto, porque a pesar de que el MTX es una molécula hidrofóbica y que este tipo de interacciones prevalecen en un nanogel colapsado, no se quiso optar por esta vía, dado que se esperaba mayor difusión del fármaco con el nanogel hinchado, a modo que el medio con el fármaco disuelto tuviera mayor tendencia a entrar dentro de él.

Para la inclusión de MTX sódico sobre el nanogel recubierto, se adecuó una metodología en la que se pudiera separar la fracción de fármaco unida al sistema de la fracción libre. En este sentido, se enfrentó con la suavidad y adhesividad del nanogel, así como su unión débil con el fármaco. Esto, porque el uso de fuerzas mecánicas como las de la centrifugación, podrían llegar a separar cierta cantidad de principio activo unido, trayendo resultados poco confiables; además que el uso de filtros tampoco resultaría viable, dado que el sistema podría quedar adherido, lo que complicaría su recuperación para pruebas posteriores.

El método utilizado permitió mediciones directas del fármaco, sin la necesidad de tener que someterlo a algún tratamiento extra. El uso de bolsas de diálisis con un tamaño de poro entre 12 y 14 KDa pudo retener a las partículas de nanogel que tienen un peso molecular aparente de 126.6 KDa, pero al mismo tiempo posibilitó la entrada y salida del fármaco en disolución, pues su peso molecular de 498.41 g/mol es mucho menor.

Cada bolsa de diálisis contenía una cantidad variable de MTX sódico y una cantidad fija de nanogel recubierto en disolución a pH de 7. Al ser puestas en un volumen fijo de una disolución con la misma concentración de MTX sódico, se estableció un equilibrio entre la concentración de MTX sódico dentro y fuera de cada bolsa de diálisis. Conforme el MTX sódico libre se fue adsorbiendo en el nanogel, se alteró el equilibrio del sistema de diálisis, dado que, en ese momento, la concentración de fármaco libre dentro de la bolsa fue menor a la del exterior. Para volver al equilibrio, cierta cantidad de fármaco equiparable a la adsorbida, ingresó dentro de la bolsa de diálisis. De este modo, al cuantificar la concentración de la disolución de MTX sódico exterior, se pudo correlacionar con la cantidad de fármaco que se une. Este proceso se esquematiza en la Figura 77.

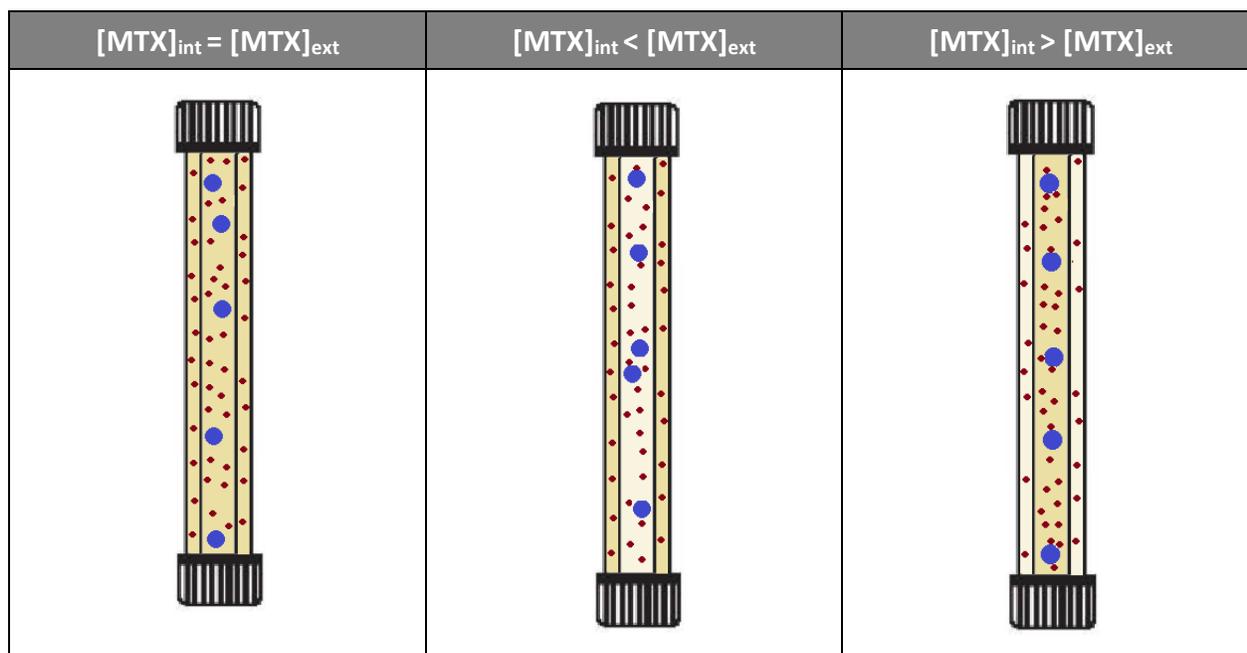


Figura 77. Alteración en el equilibrio de [MTX] entre el interior y el exterior del sistema

La cuantificación del MTX sódico pudo efectuarse a través de técnicas espectrométricas de UV-VIS, porque el MTX sódico posee grupos cromóforos que permiten detectar con precisión y reproducibilidad, concentraciones mínimas de hasta $0.2761 \mu\text{M}$ a una longitud de onda de alrededor de 302 nm , según el medio utilizado.¹⁷⁸ El uso de esta metodología, implicó que las muestras obtenidas no contuvieran sistema. En caso contrario, no hubiera resultado tan perjudicial, porque ninguno de los componentes puede detectarse mediante UV-VIS, pero sí pudieron llegar a alterar la línea base de las señales.

Se realizó una cinética de adsorción, fijando la masa de nanogel y variando las proporciones molares de nanogel recubierto:MTX sódico a: 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4., a modo de seleccionar el tiempo y la cantidad de fármaco que son adecuados para el proceso.

La Figura 78, muestra la cinética de adsorción y la Tabla 31 indica el % de encapsulación y el % de entrampe, correspondientes a las 6 horas de la adsorción. La curva de calibración del MTX sódico en agua empleada para los cálculos se muestra en el Anexo 13.

Figura 78. Cinética de adsorción de las proporciones nanogel:MTX sódico: 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4

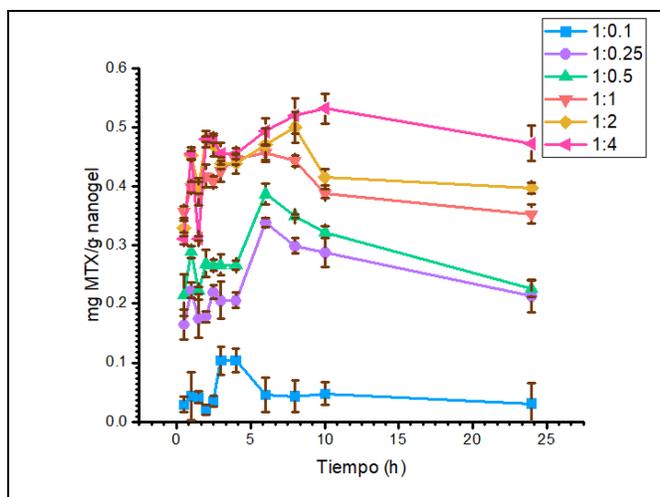


Tabla 31. % de entrampe de fármaco a las 6 horas en las proporciones nanogel:MTX sódico: 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4

Proporción Nanogel:MTX	% Encapsulación	% Entrampe
1:0.1	0.043	0.46
1:0.25	0.136	3.42
1:0.5	0.078	3.93
1:1	0.046	4.67
1:2	0.0235	4.73
1:4	0.0122	4.95

En la Figura 78 se observa que para todas las proporciones y a tiempos cortos se registró una continua entrada y salida de fármaco. Esto ocurrió porque en esos momentos aún no se llegaba al equilibrio. Éste se alcanzó, a partir de las 3 horas y es cuando no existió tanta variación en las señales medidas. A partir de este tiempo, la cantidad de MTX sódico unido se incrementó, alcanzando su punto máximo a las 6 horas. Para los tiempos posteriores, la concentración de fármaco disminuyó, al ser expulsado debido a procesos de recambios en los sitios de unión o por la naturaleza débil de las interacciones.

En la Tabla 31 se aprecia el % de encapsulación obtenido, que es la cantidad de fármaco incluido al sistema con respecto a la cantidad total adicionada en el experimento. A medida que se incrementó la proporción nanogel recubierto: MTX sódico, el % de encapsulación

disminuyó, porque la cantidad de fármaco aumentó, mientras que la cantidad de nanogel se mantuvo constante. En esta tabla, también se observa el % de entrapamiento, que relaciona la masa de principio activo adsorbido en 1 g de nanogel. Se aprecia que el porcentaje aumentó a medida que se incrementó la proporción nanogel recubierto: MTX sódico, lo cual quiere decir, que a proporciones bajas, el sistema aún tenía capacidad para incluir más fármaco, pero que éste se empezó a saturar en la proporción 1:1, pues a partir de ese punto, el % de entrapamiento varió muy poco. La concentración máxima de MTX sódico alcanzada a las 6 horas, no cambió significativamente, al utilizar las proporciones 1:1, 1:2 y 1:4. Por esta razón, se decidió utilizar la proporción 1:1 para la adsorción del MTX sódico en el nanogel y un tiempo de 6 horas. Esto se puede observar en el ANOVA, mostrado en el Anexo 14.

Comparar los datos obtenidos con lo que muestra la literatura, resultó difícil, ya que los artículos que reportan la adsorción de MTX sódico en sistemas blandos como; hidrogeles, microgeles y nanogeles, son muy pocos, además el tipo de método de inclusión que utilizan son diferentes, sin embargo, se reportan el uso de cantidades de fármaco menores a una proporción de 1:1, así como tiempos de adsorción que van de 3 ó 4 y hasta 24 horas.^{179, 180, 181} En este sentido, cabe mencionar que estas características varían de acuerdo con el tipo de materiales y componentes, así como las características del sistema en cuestión.

El % de entrapamiento obtenido a las 6 horas y con una proporción de 1:1 de nanogel recubierto: MTX sódico indica que se incluye una cantidad de 0.467 mg de MTX sódico por cada g de nanogel recubierto. Esto pudiera parecer sumamente bajo, sin embargo, si se considera que la dosis semanal de este fármaco para el tratamiento de la artritis reumatoide oscila entre 7.5 y 10 mg por semana, se necesitarían utilizar entre 1.6 y 2.1 g de nanogel, respectivamente, para alcanzar estas cantidades de MTX sódico. Estas cantidades de nanogel pueden ser fácilmente dispersadas en pequeñas cantidades de agua destilada, de modo que podría administrarse sin problemas mediante vía subcutánea, que es lo usual para el MTX. Por esta razón este acarreador es un medio viable para administrar MTX sódico.

6.4.1 Elaboración de isotermas de inclusión del MTX sódico en el nanogel recubierto con HA

Se realizó la isoterma de inclusión del nanogel recubierto con una proporción de 1:1 de nanogel recubierto:MTX sódico. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 79, mientras que el ajuste a diversos modelos se muestra en la Tabla 32.

El parámetro empleado para determinar el modelo de isoterma de mejor ajuste fue el coeficiente de determinación (R^2), a medida que su valor fuera más cercano a 1.¹⁸² El modelo de mayor ajuste fue el de *Sips*, también conocido como de *Langmuir-Freundlich*, con una R^2 de 0.97226. Como su nombre lo indica, este modelo se basa en los de Langmuir y *Freundlich*, simultáneamente y permite estudiar a las adsorciones heterogéneas.¹⁸³ En este caso, el nanogel recubierto no es homogéneo, porque existen zonas en su superficie

que no contienen HA, así como otras regiones en las que se concentra una mayor cantidad de este polisacárido.

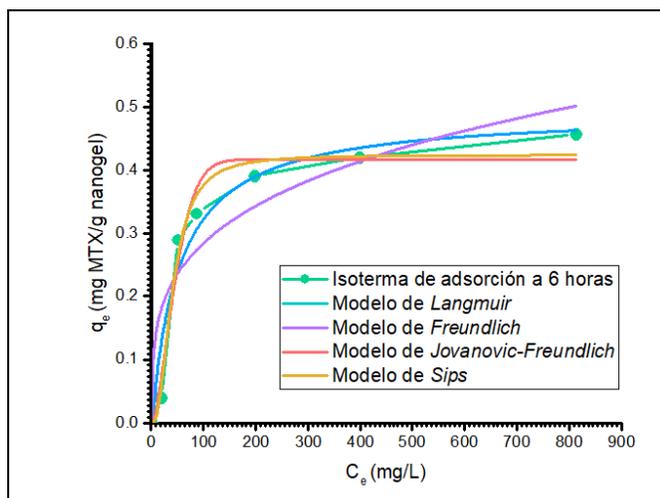


Figura 79. Isoterma de adsorción del nanogel NV7.5 2E recubierto con MTX sódico a las 6 horas

Tabla 32. Ajuste al modelo de isoterma de adsorción para nanogel NV7.5 2E recubierto con MTX sódico a las 6 horas

Modelo	R ²
Langmuir	0.9433
Freundlich	0.8473
Jovanovic-Freundlich	0.96778
Sips	0.97226

Tabla 33. Parámetros de la isoterma de adsorción del nanogel NV7.5 24 recubierto con MTX a las 6 horas de acuerdo con modelo de Sips

$q_e = \frac{q_s(K_s C_e)^m}{1 + (K_s C_e)^m}$	
Parámetro	Valor
q _s	0.4956 (mg MTX/ g nanogel)
K _s	0.2524 (L/mg) ^{2.25288}
m	2.25288

Otro tipo de isoterma para adsorbatos heterogéneos es el de *Jovanovic-Freundlich*, para el cual se obtuvo una R² de 0.95166 y que fue el segundo de mejor ajuste. Este modelo igualmente toma ciertos principios contemplados en la isoterma de *Langmuir*, pero a diferencia del de *Sips*, es una representación más real del comportamiento del sistema, ya que considera cierto contacto entre las moléculas de adsorbente que se han adsorbido y las que no.¹⁸⁴ Una posible explicación de por qué no se tuvo tanto ajuste a este modelo, es por la cinética de adsorción, en la que el punto máximo se dio a las 6 horas, después de las cuales, se presentó una disminución en la concentración de MTX sódico unido al nanogel, debido a un proceso de desorción. Es posible que, a las 6 horas, el porcentaje de fármaco desadsorbido no haya sido tan grande, de manera que no representó una interferencia significativa como para ajustar a *Jovanovic-Freundlich*.

Es evidente que el ajuste para los modelos individuales de *Langmuir* y para *Freundlich* se tenga un nivel de ajuste menor; con R^2 de 0.93196 y de 0.81676, respectivamente; dado que el material no es homogéneo. El modelo de *Sips* se comporta parecido a la isoterma de *Freundlich* a bajas concentraciones, pero como la de *Langmuir* a concentraciones más altas.¹⁸⁵ Dado que se utilizan una proporción 1:1 (m/m) de nanogel y MTX sódico, esta relación se puede considerar alta y eso explica por qué el coeficiente de determinación para el modelo de *Langmuir* no es tan bajo. Considerando esta descripción, se puede afirmar que a pesar de la heterogeneidad de su superficie, el nanogel recubierto posee un número finito y de sitios activos equivalentes de adsorción, que forman una monocapa. Desafortunadamente, hay pocos artículos que refieran a la elaboración de isotermas de adsorción con nanogeles y el número se reduce aún más al considerar a este sistema en particular, de modo que resulta imposible comparar con alguna otra fuente bibliográfica.

Como todas las teorías de adsorción, el ajuste al modelo de *Sips*, implica la obtención de ciertos parámetros que brindan más información del sistema, tales como: la capacidad máxima de adsorción (q_{ms}), una constante de equilibrio (K_s) y el exponente de *Sips* (m_s).¹⁸³ En la Tabla 33 se muestran los valores de estos parámetros. Como primer punto, se observa un valor de q_{ms} de 0.4956, que resulta muy cercano a las capacidades máximas de absorción en las isotermas de *Langmuir* y *Jovanovic-Freundlich*, lo cual comprueba lo mencionado anteriormente respecto a la similitud entre estos. Otro parámetro muy informativo es el valor del exponente de m_s , que es de 2.25288, lo cual es indicativo de la no homogeneidad del sistema, puesto que es mayor a 1, y entre más alejado se encuentre de la unidad significa que el sistema es más heterogéneo.¹⁸⁶

A pesar de haber profundizado en el proceso de adsorción, no existe ningún indicio que permita descartar una posible absorción. Esto, porque el nanogel es un sistema blando y al estar hinchado el fármaco puede fácilmente difundir a través de los poros formados por el entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas. Desafortunadamente el método empleado para la medición del fármaco unido y en realidad, ningún otro tipo de método reportado, permiten diferenciar entre la fracción adsorbida y la absorbida.

6.4.2 Estudio de la estabilidad del sistema farmacéutico a través de la determinación del potencial zeta con DLS

El potencial zeta de una partícula coloidal brinda información sobre el grado de repulsión electrostática entre las partículas, lo que se puede correlacionar con la estabilidad de los sistemas.

En la Tabla 34 se muestran los potenciales zeta de los nanogeles sin recubrimiento, con recubrimiento y con fármaco adsorbido. Se aprecia que las partículas de nanogel NV7.5 2E presentaron un potencial zeta positivo, lo cual indica la presencia de cationes en la capa difusa. Esta carga positiva en el nanogel es debida a los grupos amina del 1VI. Se observa

que su valor fue ligeramente cercano a 30 mV, lo cual indica que se trata de un sistema poco estable, de acuerdo con la teoría DLVO.

Tabla 34. Potencial zeta de nanogel NV7.5 2E sin recubrir, NV7.5 2E con recubrimiento y NV7.5 2E con recubrimiento y MTX adsorbido

Formulación	Potencial zeta (mV)
Nanogel NV7.5 2E	27.50 ± 0.65
Nanogel NV7.5 2E recubierto	-9.87 ± 0.97
Nanogel NV7.5 2E recubierto con MTX sódico	-4.56 ± 1.03

Cuando el nanogel se recubre con HA, el potencial zeta se vuelve negativo, lo cual tiene que ver con los grupos carboxilo que presenta, mismos que atraen a cierta cantidad de aniones como contra-iones y dado que el recubrimiento no es homogéneo, existen zonas sin recubrir, en donde prevalece ciertos cationes y es la razón por la cual el valor numérico del potencial no es muy grande. En este caso, se mejoró la estabilidad del sistema, debido al impedimento estérico de las largas cadenas de HA. Por otro lado, se aprecia que el potencial zeta del nanogel recubierto con MTX sódico incluido fue del mismo signo que el recubierto, pero en valor numérico disminuye. Esta ligera modificación sucedió debido al fármaco en el exterior del sistema. A pesar de este cambio, las partículas de nanogel pudieron repelerse entre sí, lo cual evitó su aglomeramiento y favoreció la estabilidad del sistema. Las diferencias entre el potencial zeta de los sistemas se observa en el ANOVA del Anexo 15.

6.5 Estudios de liberación *in vitro* de nanogeles recubiertos cargados con MTX sódico

Para evaluar que la liberación del MTX contenido en los nanogeles dependía del pH y la temperatura del medio, se tomaron en cuenta las 4 condiciones que se detallan en la Tabla 35.

Se aprecia que, la condición 1 no refiere a ninguna zona fisiológica en particular, pero permitió mostrar el comportamiento del sistema antes de ser administrado. Por otro lado, con la condición 2 se simulaban las características fisiológicas de tejidos u órganos sanos. Finalmente, las condiciones 3 y 4 corresponden al ambiente de las zonas inflamadas. La diferencia entre ambas, es que la temperatura alcanzada en la condición 4 es mayor, permitiendo reproducir el entorno de las articulaciones artríticas.

Tabla 35. Características de pH y temperatura de condiciones para liberación *in vitro*

Condición de liberación	pH	Temperatura (°C)
1	7	25
2	7	37
3	5	37
4	5	39.5

Las características físicas del nanogel dificultaron la realización de los experimentos de liberación *in vitro* convencionales, en los que se busca separar el sistema cargado del fármaco liberado en las alícuotas que se toman. Esto porque tanto los métodos de centrifugación, como los de microfiltración, implicaban la pérdida del sistema estudiado, que al no poder ser cuantificado, podía alterar los resultados en el curso del experimento. Por esta razón se tuvo que modificar el método habitual, a modo de poder separar el principio activo libre, sin quitar el resto del sistema cargado.

Para esto se montaron dos celdas de *Franz* en posición vertical, con una membrana de diálisis con un poro de 12 a 14 kDa, entre ellas, tal como se muestra en la Figura 80. En la celda inferior se colocó el nanogel recubierto cargado con MTX sódico disperso en el medio correspondiente, mientras que la celda superior se mantuvo vacía.

A través de la aplicación de la presión generada por el vacío fue posible separar el MTX sódico libre, al transferir el contenido de la celda superior a la inferior. Esto gracias a los poros de la membrana de diálisis que eran lo suficientemente pequeños como para retener al sistema con fármaco encapsulado, dejando pasar únicamente al MTX sódico disuelto.

De este modo, se pudo separar el fármaco liberado, conservado el resto del sistema en la celda superior. Por lo que únicamente bastaba con adicionar más medio en ésta, para continuar con las demás determinaciones.

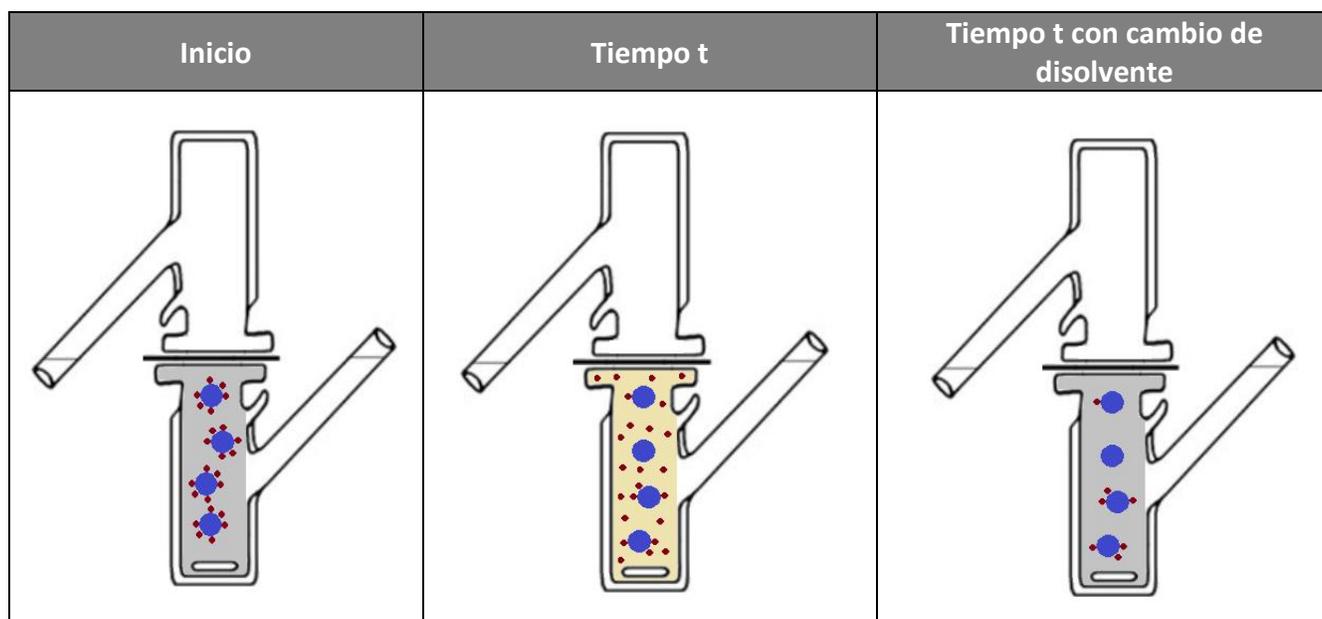


Figura 80. Sistema *in vitro* en celdas de *Franz* en diferentes tiempos a lo largo de la determinación

Este procedimiento permitió mantener constante la cantidad de nanogel cargado durante el transcurso de todo el experimento, conservando en todo momento las condiciones *sink*.

Para realizar la cuantificación del MTX en la cinética de liberación, se consideraron las curvas de calibración mostradas en los Anexos 16 y 17. Los resultados obtenidos en la liberación *in vitro* se presentan en la Figura 81.

Al tiempo cero de la cinética de liberación, se utilizó la presión de vacío, para eliminar el fármaco no adsorbido en el sistema. Se observó que para todos los casos, esta cantidad coincide con el excedente de MTX (MTX no absorbido) que fue cuantificado en las cinéticas de inclusión de la sección pasada.

A pesar del proceso de lavado realizado, se aprecia un efecto *burst* para todas las condiciones, pues existe una liberación inmediata a tiempos muy cortos. Esto implica la presencia de cierta cantidad de fármaco que no logró ser extraída.

Se observa que la salida del fármaco fue mayor para las condiciones 3 y 4, liberándose más del 90% de su contenido. En cambio, para las condiciones 1 y 2, este porcentaje no superó el 60%.

En las Tablas 36, 37, 38 y 39, se muestra el ajuste de datos de las cinéticas a un modelo de liberación teórico, utilizando los criterios R^2 , MSC, AIC y SS. Para las 4 condiciones, la liberación se ajustó al modelo de *Peppas-Sahlin*, cumpliendo en todos los casos con todos los criterios establecidos.

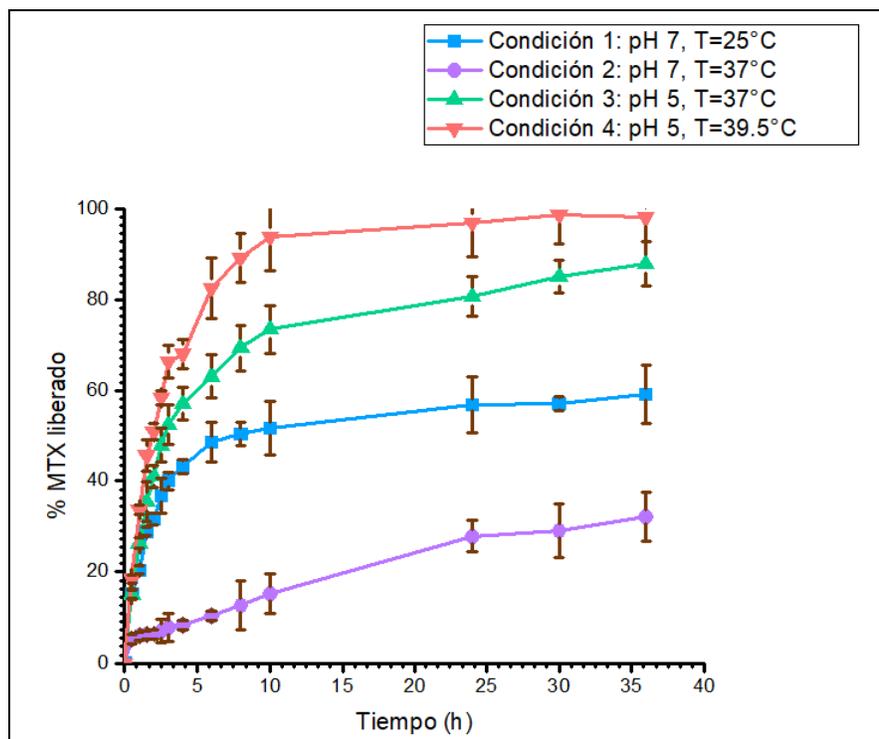


Figura 81. Cinéticas de liberación *in vitro* de MTX en nanogel NV7.5 2E recubierto en diferentes condiciones de pH y temperatura

Capítulo 6. Resultados y discusión

Tabla 36. Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación *in vitro* de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en condición 1: pH=7, T=25°C

Parámetro de ajuste	Modelo de cinética de liberación					
	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixon-Crowel	Peppas-Sahlin
R ²	-0.4113	0.8562	0.9742	0.8818	0.842	0.9864
MSC	1.3954	1.6737	3.3934	1.3914	1.5794	3.7243
AIC	79.0235	75.1373	51.0593	90.4523	74.4490	46.4288
SS	245.1390	185.7082	33.3927	480.6632	203.9935	18.2210

Tabla 37. Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación *in vitro* de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en condición 2: pH=7, T=37°C

Parámetro de ajuste	Modelo de cinética de liberación					
	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixon-Crowel	Peppas-Sahlin
R ²	-1.1963	-0.3417	0.3876	0.9810	-0.6237	0.9831
MSC	-1.3877	-0.8948	-0.1106	3	-1.08556	3.9220
AIC	129.3596	122.4598	111.4801	90.4523	125.1309	5.2409
SS	8929.4682	5454.9097	2489.9259	480.6632	6601.5844	68.8201

Tabla 38. Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación *in vitro* de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en condición 3: pH=5, T=37°C

Parámetro de ajuste	Modelo de cinética de liberación					
	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixon-Crowel	Peppas-Sahlin
R ²	-0.5879	0.5788	0.6357	0.8755	-0.6237	0.9831
MSC	-0.9589	0.3684	0.5135	1.4443	-1.0856	3.1922
AIC	136.4195	117.8411	115.8091	102.7785	125.1309	65.2409
SS	14785.3623	3922.0220	3392.1551	1159.3393	6601.5844	68.8201

Tabla 39. Parámetros de ajuste a modelo de cinética de liberación *in vitro* de MTX para nanogel NV7.5 2E recubierto en condición 4: pH=5, T=39.5°C

Parámetro de ajuste	Modelo de cinética de liberación					
	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixon-Crowel	Peppas-Sahlin
R ²	-0.9190	0.8962	0.4844	0.9384	0.0712	0.9902
MSC	-1.1862	2.4712	0.1284	1.1653	-0.0799	2.9082
AIC	143.5728	88.3694	125.1693	110.6526	118.4488	86.2521
SS	24645.3353	33.9145	6619.7326	2034.5759	7766.7241	308.6762

Para todos las condiciones, el modelo de orden cero fue el que presentó menor ajuste. En este caso, no se tiene información respecto al porcentaje de desintegración de los sistemas conforme pasa el tiempo, pero el poco ajuste pudo deberse a que se obtuvo un grado de liberación considerable a tiempos cortos que no fue sostenido durante todo el intervalo estudiado.

En cuanto a las cinéticas de primer orden, se aprecia que existe un alto nivel de ajuste, dado que esta teoría es aplicable para sistemas matriciales porosos. En este sentido, los nanogeles pueden fungir como una matriz suave con poros que se forman por los entrecruzamientos entre sus cadenas poliméricas.

El modelo de *Higuchi*, considera matrices con difusión *Fickiana*, sin embargo, toma en cuenta algunas restricciones que no aplican para este sistema, como lo es, un grado de hinchamiento despreciable. Como el grado de hinchamiento de estos nanogeles es relevante en la liberación del fármaco, el grado de ajuste a este modelo no fue tan grande.

La liberación de fármaco a través de hidrogeles es descrita por *Korsmeyer-Peppas*, razón por la que los grados de ajuste obtenidos fueron elevados.

En este caso el uso de un modelo derivado de *Korsmeyer-Peppas*, como el del *Peppas-Sahlin*, permitió conocer la contribución de diferentes mecanismos en el proceso de liberación.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura, pues tanto el modelo de *Korsmeyer-Peppas*, como el de *Peppas-Sahlin* suelen ser los más empleados para describir la liberación de principios activos de microgeles y nanogeles.

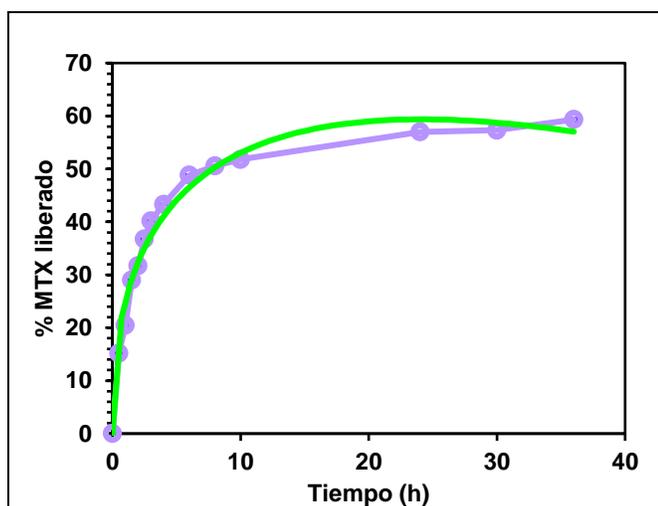


Figura 82. Ajuste de liberación *in vitro* observada (lila) con modelo *Peppas-Sahlin* (verde claro) para la condición

1

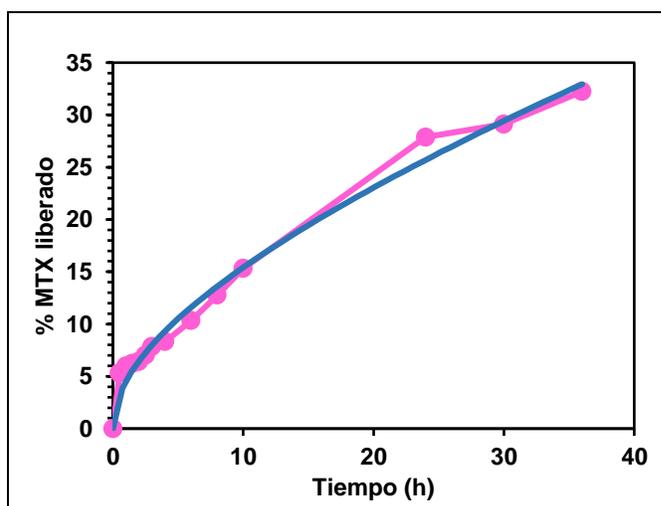


Figura 83. Ajuste de liberación *in vitro* observada (rosa) con modelo *Peppas-Sahlin* (azul oscuro) para la condición

2

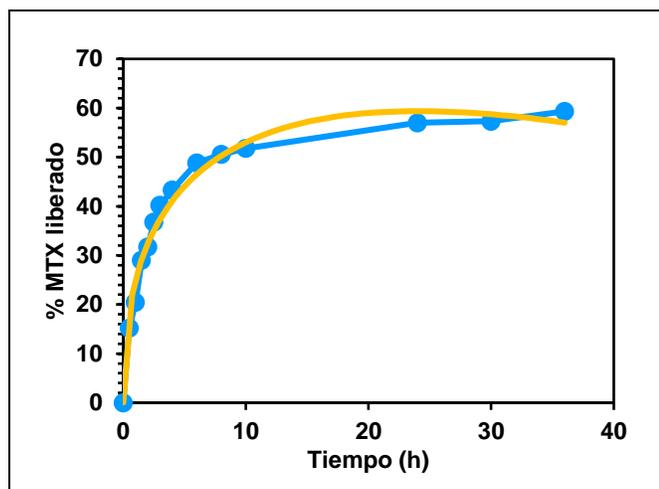


Figura 84. Ajuste de liberación *in vitro* observada (azul rey) con modelo *Peppas-Sahlin* (amarillo) para la condición 3

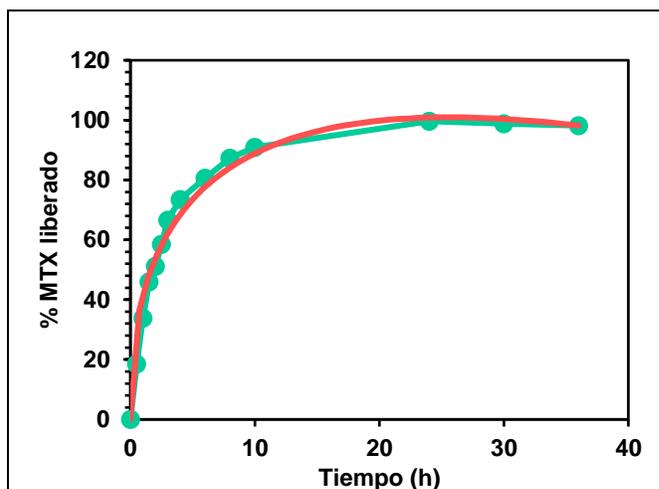


Figura 85. Ajuste de liberación *in vitro* observada (verde aguamarina) con modelo *Peppas-Sahlin* (rojo) para la condición 4

Las condiciones 1, 3 y 4 tienen un pH y una temperatura que favorecen el hinchamiento del nanogel. Para estos tres casos, la liberación fue inmediata y sostenida durante las primeras 10 horas del experimento y después de ese punto, se volvió más lenta. En las Figuras 82, 84 y 85, se observa el ajuste del modelo *Peppas-Sahlin* para estas tres condiciones. *Peppas-Sahlin* considera que la liberación de principio activo se lleva a cabo mediante la contribución de dos mecanismos: uno difusional que cumple la teoría de *Fick*; y otro de relajación. La selección del mecanismo de liberación se hace en función a los valores de las constantes k_1 y k_2 ; también llamados F , para la difusión de *Fick*; y R , en la relajación, respectivamente. Para la determinación de F y R , se debe realizar el ajuste considerando hasta el tiempo en el que se ha liberado el 60% del contenido total de principio activo en el nanogel. En la Tabla 40, se muestra que los valores de este ajuste no varían significativamente respecto al realizado hasta el 100%.

Tabla 40. Parámetros de ajuste a modelo *Peppas-Sahlin* para la liberación del 60% de MTX en nanogel NV7.5 2E recubierto para los medios 3 y 4

Parámetro de ajuste	Modelo de cinética de liberación			
	Medio 3		Medio 4	
	100%	60%	100%	60%
R^2	0.9831	0.973	0.9902	0.9955
MSC	3.1922	2.4142	2.9082	3.4696
AIC	65.2409	46.7859	86.2521	28.0417
SS	68.8201	92.9231	308.6762	23.3084

Los parámetros cinéticos del modelo *Peppas-Sahlin* obtenidos con el ajuste de datos al 60%, se muestran en la Tabla 41. Se aprecia que para las condiciones 1, 3 y 4, el valor de F fue muy superior al de R. Esto quiere decir que en el proceso de liberación prevaleció el mecanismo de difusión sobre el de la relajación. De este modo, el MTX sódico que se encontraba encapsulado en el sistema, pudo difundir fácilmente al favorecer su grado de hinchamiento.

Tabla 41. Parámetros cinéticos del modelo *Peppas-Sahlin* para la liberación de MTX en nanogel NV7.5 2E recubierto para los medios 1, 2, 3 y 4

Medio	F (k_1)	R (k_2)	n
1	28.363	-3.388	0.45
2	4.020	0.450	0.45
3	28.538	0.678	0.45
4	20.353	12.569	0.45

En la condición 4, el valor de R se incrementó considerablemente, debido a que el hinchamiento presentado del sistema fue mayor. Como consecuencia, la densidad de entrecruzamiento en las cadenas poliméricas del nanogel disminuyó y el sistema se relajó. Cuando esto sucedió, el tamaño de los espacios entre los entrecruzamientos se incrementó, facilitando la salida del fármaco.

En la condición 1, el grado de hinchamiento en el sistema fue menor, porque presentó un menor carácter hidrofílico. Esto provocó que la cantidad de fármaco liberado no fuera tan grande en comparación a lo ocurrido con las condiciones 3 y 4.

La liberación en la condición 2 tiene un comportamiento diferente, porque el sistema se encontraba colapsado. La Figura 83 muestra el ajuste del modelo *Peppas-Sahlin* con la cinética de liberación obtenida. En este caso, las cadenas poliméricas del nanogel se encontraban más comprimidas, razón por la cual el sistema presentó un valor de F de 4.020, que es muy por debajo de los valores obtenidos cuando el nanogel estaba hinchado. Por ese motivo se esperaba que la difusión del fármaco hacia el medio fuera más lenta. Por otro lado, el valor de R obtenido fue muy pequeño, puesto que las cadenas poliméricas del sistema no estaban relajadas. Estos factores contribuyeron a que se haya liberado únicamente el 30% del contenido total.

Los ANOVA mostrados en el Anexo 18 y 19, muestran que los parámetros F y R son diferentes para todas las condiciones evaluadas

El modelo de *Peppas-Sahlin*, arroja un exponente m, cuyo valor es capaz de predecir la geometría del sistema. Para todas las condiciones, éste fue de 0.45, lo cual corresponde a una geometría de cilindro. Esto coincide con la morfología alargada mostrada por las micrografías de SEM. Se observa, que el valor de m en la condición 2, también fue de 0.45,

por lo que, a pesar del colapso, el sistema conservó su forma, ya que el HA se mantuvo unido a él.

Con estos resultados, se observa que el nanogel recubierto desarrollado fue capaz de controlar la liberación del MTX sódico ante las condiciones de pH y temperatura de las articulaciones inflamadas, por lo que podría ser empleado para el tratamiento de la artritis reumatoide u otra enfermedad que presente un ambiente patológico similar. Cabe señalar que el nanogel no debe formularse en medios líquidos, puesto que, se favorecería su hinchamiento y difundiría cierta cantidad de fármaco, antes de ser administrado. Para resolver este problema, lo ideal sería mantener el nanogel liofilizado y suspenderlo instantes antes de su administración, a modo de mantener la mayor cantidad de MTX dentro del sistema.

Capítulo 7. Conclusiones

Se obtuvieron partículas de nanogel monodispersas con el método de precipitación por polimerización radicalaria, al modificar la temperatura y el volumen del medio en el que se efectuó la reacción.

Se encontró que para generar nanogeles con una LCST de 36.5°C a pH 7; y de 47°C a pH 5; se necesita una proporción de NIPAM: 1 VI: MBA de 90.5: 7.5: 2.

Se consiguieron partículas de nanogel de 127.23 KDa con un d_H que osciló entre 99.6 nm, en su estado colapsado; a 451 nm, en su forma hinchada.

Las titulaciones potenciométricas mostraron que los grupos de 1VI del nanogel obtenido, se distribuyeron mayoritariamente en su superficie.

Los estudios reológicos mostraron que el nanogel presentó el comportamiento de un fluido no *Newtoniano* que adelgaza.

Se obtuvieron partículas estables de nanogel recubierto con un rendimiento del 74.0%, al adsorber físicamente HA sódico.

El HA sódico adicionado incrementó en 200 nm, el tamaño de las partículas de nanogel; además que aumentó en 117.87 KDa, su peso molecular.

Se comprobó que la presencia del HA sódico no afectó el comportamiento del nanogel ante los estímulos de pH y temperatura.

Se evidenció que se necesita un tiempo de 6 horas y una proporción de nanogel recubierto: MTX sódico de 1: 1, para alcanzar un % de entrapamiento del 4.67%.

Se encontró que el proceso de adsorción del MTX en las partículas de nanogel recubiertas sigue un modelo de *Sips*.

Se observó que en medios con pH 5 y a temperaturas superiores a 37°C, el sistema fue capaz de liberar en 12 horas más del 90% del MTX contenido; pero que un pH de 7 y a temperaturas menores a 37°C, esta liberación no superó el 60% en 24 horas.

Se encontró que el modelo de liberación de mejor ajuste para todas las condiciones evaluadas fue el de *Peppas-Sahlin*.

El modelo *Peppas-Sahlin* mostró que la liberación del MTX del nanogel se efectuó a través de un mecanismo de difusión *Fickiana* en un sistema de forma cilíndrica.

Capítulo 8. Perspectivas

La formulación de un sistema farmacéutico es un proceso arduo que requiere comprobar la total bioequivalencia del mismo con respecto a los productos innovadores o de referencia que ya se comercializan.

Hasta este punto, con este trabajo se ha cubierto la preformulación y una parte de la formulación del sistema. En este sentido, en el caso de su preformulación, se han considerado las características del fármaco en cuestión, así como las de la artritis reumatoide para la selección de los excipientes. En cuanto al proceso de formulación, el nanogel ha sido caracterizado física y químicamente, además que se ha estudiado su comportamiento simulando condiciones fisiológicas de salud y las patológicas, sin embargo aún no se tiene información sobre su biocompatibilidad, por lo que sería deseable efectuar pruebas citológicas. Por otro lado, resulta necesaria la realización de ensayos *in vivo*, particularmente en modelos de animales, a fin de comprobar la funcionalidad del sistema y determinar las posibles ventajas que trae sobre las formas farmacéuticas convencionales actualmente usadas.

Finalmente, cabe señalar que hace falta proponer una forma adecuada para su administración, ya sea como liofilizado dispersable o en disolución. Una vez logrado esto, es necesario conocer la estabilidad del sistema, de acuerdo con lo estipulado por la NOM-073-SSA1-2015. Cuando ya se logre obtener un preparado basado en el nanogel, se debe seguir lo marcado por la NOM-177-SSA1-1998, respecto a las pruebas y los procedimientos que demostrarán su intercambiabilidad. Aunado a esto, sería muy deseable trabajar en el mejoramiento de los procesos de la síntesis del sistema y posteriormente esto permitiría proponer su escalamiento.

Una vez realizado todo este proceso descrito y de obtener resultados satisfactorios, el sistema propuesto en este trabajo podría llegar a ser comercializado.

Capítulo 9. Referencias

1. GORONZY, J., WEGAND C. (2000). *Artritis reumatoide: Epidemiología, Patología y Patogenia*. En Klippel JH, Principios de las Enfermedades Reumáticas. 4° Edición. Editorial Intersistemas. México. 2000; 179-186.
2. PRETE, M., et al. (2011). *Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update*. Autoimmunity Reviews.11; 125.
3. ZUIDEMA, R.M., et al. (2015). *What do we know about rheumatoid arthritis patients' support needs for self-management? A scoping review*. International Journal of Nursing Studies. 52; 1617-1624.
4. JEFFERY, R. (2014) *Clinical features of rheumatoid arthritis*. Medicine. 45; 231-236.
5. MORCO, S., BOWDEN A. (2015) *Ulnar drift in rheumatoid arthritis: a review of biomechanical etiology*. Journal of Biomechanics. 48; 725-728.
6. GLYNN, L.E., (1971). *Pathology, pathogenesis, and etiology of rheumatoid arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases. 31; 412-419.
7. IZQUIERDO, E., (2011). *Los fibroblastos sinoviales en la patogenia de la angiogénesis reumatoide*. Universidad Complutense de Madrid. p 15-20.
8. CARDIEL, M., et al. (2013). *Actualización de la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología*. Reumatología Clínica. 14 (4); 227-240.
9. STEINER, M., MÚÑOZ-FERNÁNDEZ, S., (2013). *Artritis reumatoide: fármacos modificadores de la enfermedad*. Jano: Medicina y Humanidades. 9 (5); 297-302.
10. BOHÓRQUEZ, C., et al., (2014). *Actualización en el tratamiento de la artritis reumatoide*. Medicine. 11 (69); 4112-4121.
11. CORREIA, C., CUADROS, E., (2007). *Tratamientos de la artritis reumatoide*. Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina. 173; 7-9.
12. SHAJI, J., LAL, M., (2013). *Nanocarriers for targeting in inflammation*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 6 (3); 3-12.
13. NAOR, D., NEDVETXKI, S., (2003). *CD44 in rheumatoid arthritis*. Arthritis Research and Therapy. 5 (3); 105-115.
14. ARABI, L., et al., (2015). *Targeting CD44 expressing cancer cells with anti-CD44 monoclonal antibody improves cellular uptake and antitumor efficacy of liposomal doxorubicin*. Journal of Controlled Release. 220; 275-286.
15. FARR, M., et al., (1985). *Significance of the hydrogen ion concentration in synovial fluid in rheumatoid arthritis*. Clinical and Experimental Rheumatology. 3; 99-104.
16. COLLINS, A.J., COSH, J.A., (1970). *Temperature and biochemical studies of joint inflammation: A preliminary investigation*. Annals of the Rheumatic Diseases. 29 (4); 386-392.
17. BARTSCH, E., et al., (1998). *Spherical Microgel Colloids-Hard Spheres from Soft Matter*. Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie. 102 (11); 1597-1602.
18. SINGH, J. (1993). *Swelling of Polymer Gels*. Department of Chemical Engineering, McGill University, Capítulo 1; p 1-3.
19. PEKCAN, O., KARA, S., (2012). *Gelation Mechanisms*. Modern Physics Letters B, 26(27); 123
20. GRESZTA D., et al., (1994). *"Living"Radical Polymerization: Possibilities and Limitations*. Macromolecules, 27(3); 638-644.
21. BAKER, W. (1949), *A New Macromolecule. Relation to Sol and Gel as Structural Elements of Synthetic Rubber*. Rubber Chemistry and Technology. 22(4); 935-955.
22. FERNÁNDEZ-NIEVES, A., et al. (2011). *Microgel Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
23. LEITE, E., et al., (2012). *Crystallization and growth of colloidal nanocrystals*. Springer Briefs.
24. ALGHURABI, H., (2015). *Colloidal Dispersions*. Physical Pharmacy of University of Kerbala.
25. HIDALGO-ÁLVAREZ, R. (2009). *Structure and Functional Properties of Colloidal Systems*. Taylor & Francis Group.

26. SATOH, A., (2003). *What Kinds of Molecular-Microsimulation Methods are Useful for Colloidal Dispersions*, 17; 1-6.
27. DAS NEVES, M., *et al.*, (2010). *Estabilidad de las dispersiones coloidales*. Tecnología Farmacéutica, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
28. GRAHAM, N. B., CAMERON, A., (1998). *Nanogels and microgels: The new polymeric materials playground*. Pure & Applied Chemistry, 70(6); 1271-1275.
29. DODIUK, H., GOODMAN, S. H., (2014). *Handbook of Thermoset Plastics*. Elsevier Inc.
30. GRAHAM, N., MAO, J., (1996). *Microgels Part 2: Solution polymerization using urethane stepgrowth mechanism*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 118(3); 211-220.
31. YU, Y., FUNKE, W., (1982). *Reactive microgels by emulsion polymerization of unsaturated polyester resins*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie Banner, 113(1); 187-202.
32. MURRAY, M.J., SNOWDEN, M.J., (1995). *The preparation, characterisation and applications of colloidal microgels*. Advanced in Colloid and Interface Science, 54; 73-91.
33. GUYOT, A., (2002). *Recent Progress in Reactive Surfactants in Emulsion Polymerization*. Macromolecular Symposia, 179(1);105-132.
34. KHOEE, S., ASADI, H., (2015). *Nanogels: Chemical Approaches to Preparation: Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. CRS Press.
35. PELTON, R., (2004). *Unresolved issues in the preparation and characterization of thermoresponsive microgels*. Macromolecular Symposia, 207(1); 57-66.
36. YU, Y., FUNKE, W., (1981). *Surfactant Properties of Unsaturated Polyesters*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie Banner, 103(1); 203-2016.
37. MA, J., *et al.* (2010). *Synthesis and characterization of Poly(N-isopropylacrylamide)(Poly(Acrylic acid) semi-IPN nanocomposite microgels*. Journal of Colloidal Interface Science. 341(1); 88-93.
38. GRIFFIN, J.M., *et al.*, (2007). *Preparation and characterization of surfactant-free stimuli-sensitive microgel dispersions*. Journal of Applied Polymer Science, 104(3); 1912-1919.
39. BONHAM, J.A., *et al.*, (2014). *Non-aqueous microgel particles: Synthesis, properties and applications*. Soft Matter, 10; 9384-9398.
40. WILKINSON, M. C., *et al.*, (1999). *The cleaning of polymer Colloids*. Advances in Colloid and Interface Science, 81(2); 77-165.
41. HERNÁNDEZ, F.J, (1994). *Experimental study of ionic cleaning of polystyrene latexes*. Afindad.
42. GOODWIN, J.W., *et al.*, (1973). *The preparation and characterization of polymer latices formed in the absence of surface active agents*. British Polymer Journal, 5; 347-362.
43. HARDING, I. H., HEALY, T. W., (1982). *Purification of amphoteric polystyrene latex Colloids*. Journal of Colloid Interface Science, 89; 185-201.
44. HASEGAWA, T., (2017), *Quantitative Infrared Spectroscopy for Understanding of a Condensed Matter*. Springer.
45. BARRIOS, V., *et al.*, (2012). *FTIR: An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials*. Materials Science, Engineering and Technology.
46. HOLLAND-MORITZ, K., SIESLER, H. W., (1976). *Infrared Spectroscopy of Polymers*. Applied Spectroscopy Reviews, 11(1); 1-55.
47. HOLLAND-MORTIZ, K., SIESLER, H. V., (1976). *Infrared Spectroscopy of Polymers*. Applied Spectroscopy Reviews, 11(1); 1-55.
48. (2004), *Zetasizer Nano Series User Manual*. Malvern Instruments Ltd.
49. SAKHO, E., *et al.*, (2017). *Dynamic Light Scattering (DLS)*. Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization, p. 37.49
50. BUSECK, P. R., *et al.*, (1988). *High-resolution Transmission Electron Microscopy: and Associated Techniques*. Oxford University Press.
51. INKSON, B. J., (2016). *Scanning electron microscopy (SEM) and transmisión electron microscopy (TEM) for materials characterization*. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods, Elsevier Ltd.
52. WILLIAMS, D., CARTER, C. B., (2009). *Transmission Electron Microscopy, a Textbook for Materials Science*. Springer.
53. JAMES, T., (1998). *Fundamentals of NMR*. Department of Pharmaceutical Chemistry.

54. IONIN, B. I., ERSHOW, B. A. (1970). *The fundamentals of NMR Spectroscopy*. Springer.
55. KEELER, J., (2002). *Understanding NMR Spectroscopy*. University of Cambridge, Department of Chemistry.
54. EDWARDS, J. C. (2001). *Principles of NMR*. Process NMR Associates LLC.
55. SUNTHAR, P. (2010). *Polymer Rheology*. Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology.
56. MACOSKO, C. W., (1994). *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. Wiley.VCH.
57. GROOVER. M., (1997). *Fundamentos de manufactura Moderna: Materiales, procesos y sistemas*. Pearson Prentice Hall.
58. SENFF, H., RICHTERING, W., (2000). *Influence of cross-link density on rheological properties of temperature sensitive microgel suspensions*. Colloid and Polymer Science, 278 (9); 830-440.
59. WOLFE, M. S., SCOPAZZI, C., (1989). *Rheology of Swellable Microgel Dispersions: Influence of Crosslink Density*. Journal of Colloid and Interface Science, 133(1); 265-277.
60. AUERHAMMER, G., et al., (2008). *Progress in Colloid and Polymer Science: Surface and Interfacial Forces; from Fundamentals to Applications*. Springer.
61. WELSCH, N., et al. (2010). *Microgels as Nanoreactors: Applications in Catalysis*. Advances in Polymer Science, 234; 129-163.
62. CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. Informa Medical
63. SHARMA, D., et al., (2018). *Nanotechnology-based drug delivery systems: Challenges and opportunities*. Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems, p. 39-79.
64. DOMÍNGUEZ, P., (2006). *Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia*. Servicio de Salud de Castilla de la Mancha.
65. BHOWMIK, D. (2012). *Controlled release drug delivery systems*. The Pharma Innovation, 1(10); 24-32.
66. SÁENZ, V., et al., (2003). *Liberación controlada de fármacos: Aplicaciones biomédicas*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 4(2); 111-122.
67. BRUSCHI, M. L., (2015). *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Elsevier Ltd.
68. LAURILA, P., et al., (2014). *Fick's Law of Diffusion: Thermodynamics, Diffusion and the Kirkendall Effect in Solids*. Springer.
69. SIEMANN, J., et al., (1998). *Calculation of the Dimensions of Drug Polymer Devices Based on Diffusion Parameters*. Journal of Pharmaceutical Science, 87(7); 827-832.
70. CRANK, J., (1956). *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press.
71. ÁLVAREZ-LORENZO, C., CONCEIRO, A., (2013). *Smart Materials for Drug Delivery, Volume 1*, Royal Society of Chemistry.
72. BAZBAN-SHOTORBANI, S., et al., (2017). *Revisiting structure-property of pH-responsive polymers for drug delivery applications*. Journal of Controlled Release, 23;46-63.
73. HUH, K.M., et al., (2012). *pH-sensitive polymers for drug delivery*. Macromolecular Research, 20(3); 224-233.
74. GUPTA, P., et al., (2002). *Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery*. Drug discovery today, 7(10); 569-579.
75. KANAMALA, M., et al., (2016), *Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumor targeted drug delivery: A review*. Biomaterials 85; 152-167.
76. GENEVA, I., et al. (2019). *Normal Body Temperature: A systematic Review*. Open Forum Infectious Diseases, 6(4); 32
77. KELLY, G., (2006). *Body Temperature Variability (Part 1): A Review of the History of Body Temperature and its Variability Due to Site Selection, Biological Rhythms, Fitness, and Aging*. Alternative Medicine Review, 11(4); 278.
78. ZHU, Y., et al. (2016). *Design of Thermoresponsive Polymers with Aqueous LCST, UCST or Both*. Macromolecules, 49(2); 672-680.
79. VASILE, C., KULSHRESHTHA, A.K., (2003), *Handbook of Polymer Blends and Composites*; Rapra Technology Ltd.
80. WARD, M., GEORGIU, T. K., (2011). *Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications*. Polymers, 3(3); 1215-1245.
81. CONSTANTIN, M., et al., (2011). *Lower critical solution temperature versus volume phase transition temperature in thermoresponsive drug delivery systems*. Polymer Letters, 5(10); 839-848.

82. HEMMATI, K., GHAEMY, M., (2016). *Synthesis of new thermo/pH sensitive drug delivery systems based on tragacanth gum polysaccharide*. International Journal of Biological Macromolecules, 87; 415-425.
83. BOUTRIS, C., *et al.*, (1997). *Characterization of the LCST behaviour of aqueous poly(N-isopropylacrylamide) solutions by thermal and cloud point techniques*. Polymer, 38(10); 2567-2570.
84. MANNELLA, G. A., *et al.*, (2013). *Measurement of cloud point temperatura in polymer solutions*. Review of Scientific Instruments, 84(7).
85. FERGUSON, H. F., *et al.*, (2000). *A review of analytical applications of calorimetry*. Thermochimica Acta, 363 (1-2), 1-21.
86. HANG, Q., *et al.* (2017). *Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperatura: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions*. Materials Horizons, 4(2); 109-116.
87. BOKOBZA, L., (2017). *Spectroscopic Techniques for the Characterization of Polymer Nanocomposites: A review*. Polymers, 10(7), 1-20.
88. Müller, A., MICHELL, R. M., (2016). *Differential Scanning Calorimetry of Polymers*. Qipeng Guo.
89. MENCZEL, J., PRIME, R. B., (2009). *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*. A John Wiley & Sons, Inc.
90. HAN, Y., PARK, K., (2011). *Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility*. Journal of Controlled Released, 153; 198-205.
91. MANISH, G., VIMUKTA, S., (2011). *Targeted drug delivery system: A review*. Research Journal of Chemical Sciences. 1 (2); 137
92. RANI, K., PALIWAL, S., (2014). *A review on targeted drug delivery: Its entire focus on advanced therapeutics and Diagnostics*. Scholars Journal of Applied Medical Science, 2(1C); 328-331.
93. DANHIER, F., *et al.*, (2010). *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. Journal of Controlled Released, 148; 135-146.
94. NAOR, D., NEDVETXKI, S., (2003). *CD44 in rheumatoid arthritis*. Arthritis Research and Therapy. 5 (3); 105-115
95. HOARE, T., PELTON, R., (2008). *Impact of microgel morphology on functionalized microgel-drug interactions*. Langmuir, 24(3); 1005-1012.
96. GARRET, Q., *et al.*, (1998). *Effect of charged groups on the adsorption and penetration of proteins onto and into carboxymethylated poly(HEMA) hydrogels*. Biomaterials, 19(23): 2175-2186.
97. NYSTRÖM, L., MALMSTEN, M., (2016). *Surface-bound microgels: From physicochemical properties to biomedical applications*. Advances in Colloid and Interface Science, 238; 88-104.
98. CHOON, K., *et al.*, (2017). *A Universal Isotherm Model to Capture Adsorption Uptake and Energy Distribution of Porous Heterogeneous Surface*. Scientific Reports, 1(3), 515-6.
99. LIMOUSIN, G., *et al.*, (2007). *Adsorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement*. Applied Geochemistry 22; 249-275.
100. ROSAS, V. M., (1999). *Adsorción*. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
101. AYAWEI, N., *et al.*, (2017). *Modelling and Interpretation of Adsorption isotherms*. Journal of Chemistry, 1-11.
102. (2002), *Potencial Zeta: Un curso completo en 5 min*. Zeta-Meter Inc.
103. RAMTEKE, K. H., *et al.* (2014). *Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review*. Scholars Academic Journal of Pharmacy, 3(5); 388-396.
104. BRUSCHO, M. L., (2015). *Strategies to Modify the drug release from pharmaceutical systems*. Woodhead Publishing.
105. PEPPAS, N., NARASIMHAN, B., (2014). *Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 28; 75-81.
106. DING, J., *et al.*, (2018). *Model Selection Techniques: An Overview*. IEE Signal Processing Magazine.
107. YANG, M., *et al.*, (2016). *Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis*. Journal of Controlled Release, 252; 108-124.
108. CHANG, H., *et al.*, (2017). *Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery*. Drug Discovery Today, 22(9); 1336-1441

109. RYAN, S. M., *et al.* (2013). *An intra-articular salmon calcitonin-based nanocomplex reduces experimental inflammatory arthritis*. Journal of Controlled Release; 167; 120-129.
110. SCHMITT, F., *et al.*, (2010). *Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints*. . Journal of Controlled Release, 144; 242-250.
111. SONI, G., *et al.*, (2016). *Nanogels as potential nanomedicine Carrier for treatment of cancer: A mini review of the state of art*. Saudi Pharmaceutical Journal, 24(2); 133-139.
112. SHIN, M. J., *et al.*, (2014). *A hyaluronic acid-methotrexate conjugate for Targeted therapy of rheumatoid arthritis*. Royal Society of Chemistry, 50; 7632-7635.
113. LANZALACO, S. *et al.*, (2017). *Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications*. Gels, 3(4); 36.
114. IDZIAK, I., *et al.*, (1999). *Thermosensitivity of Aqueous Solutions of Poly(N,N-diethylacrylamide)*. Macromolecules, 32(4): 1260–1263.
115. PLUNKETT, K. N., *et al.*, (2006). *PNIPAM Chain Collapse Depends on the Molecular Weight and Grafting Density*. Langmuir, 22(9); 4259–4266.
116. PEI, Y., *et al.*, (2004). *The effect of pH on the LCST of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 15(5); 585–594.
117. RICHTER, B., (2010). *Essentials of Heterocyclic Chemistry-I*.
118. GONZÁLEZ, B., *et al.*, (2015). *Química heterocíclica*. Universidad Nacional de Educación a Distancia de Madrid.
119. MENTER, P., (2000). *Acrylamide Polymerization: A practical Approach*. Bio-Rad.
120. SCHILD, H. G., (1992). *Poly(N-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application*. Progress in Polymer Science, 17; 163-249.
121. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ammonium_persulfate#section=3D-Status
122. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/potassium_persulfate#section=Solubility
123. ORAKDOGEN, N. *et al.*, (2006). *Influence of the initiator system on the spatial inhomogeneity in acrylamide-bases hydrogels*. Journal of Applied Polymer Science, 103(5); 3228-3237.
124. STRACHOTA, B., *et al.*, (2015). *Poly(N-isopropylacrylamide)–clay based hydrogels controlled by the initiating conditions: evolution of structure and gel formation*. Soft Matter, 11(48); 9291-9306
125. MAITRA, J., *et al.*, (2014). *Cross-linking in hydrogels: A review*. American Journal of Polymer Science, 4(2); 2163-1344.
126. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/Technical_Ads/al_ms_ad10_cr_slking_agents.pdf
127. ELAISSAR, A. (2003). *Colloidal Polymers: Synthesis and Characterization*. Marcel Dekker Inc.
128. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n-isopropylacrylamide>
129. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n_n_-methylenebisacrylamide#section=Melting-Point
130. HOARE, T., *et al.*, (2004). *Highly pH and Temperature Responsive Microgels Functionalized with Vinylacetic Acid*. Macromolecules, 37(7); 2544-2550.
131. BISHT, H. S., (2005). *pH-Controlled association of PEG-containing terpolymers of N-isopropylacrylamide and 1-vinylimidazole*. Polymer, 46(19); 7945-7952.
132. TEIXEIRA, C. R., (2015). *Preparation of new ion-selective cross-linked poly(vinylimidazole-co-ethylene glycol dimethacrylate) using a double-imprinting process for the preconcentration of Pb²⁺ ions*. Journal of Colloid and Interface Science, 450; 253-263.
133. STILL, T., *et al.*, (2013). *Synthesis of micrometer-size poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles with homogeneous crosslinker density and diameter control*. Journal of Colloid and Interface Science, 405; 96–102.
134. KLINGER, D., *et al.* (2012). *Stimuli-responsive microgels for the loading and release of functional compounds: Fundamental concepts and applications*. Polymer, 53(23); 5209–5231.
135. LELE, A., *et al.*, (1997). *Predictions of Bound Water Content in Poly(N-isopropylacrylamide) Gel*. Macromolecules, 30(1); 157–159.
136. LÓPERZ-LEÓN, T., *et al.*,(2006). *Cationic and Anionic Poly(N-isopropylacrylamide) Based Submicron Gel Particles: Electrokinetic Properties and Colloidal Stability*. The Journal of Physical Chemistry B, 110(10); 4629-4636

137. WAHLUND P. O., *et al.*, (2002). "Protein-Like" Copolymers: Effect of Polymer Architecture on the Performance in Bioseparation Process. *Macromolecular Bioscience*, 2(1); 33–42.
138. ROGERS, K., (2012). *The kidneys and the renal system*. Britannica Educational Publishing, New York.
139. GAO, J., *et al.*, (2003). Cross-Linker-Free N-Isopropylacrylamide Gel Nanospheres. *Langmuir*, 19(13); 5212-5216.
140. VARGA, I., *et al.*, (2001). Effect of Cross-Link Density on the Internal Structure of Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(38); 9071–9076.
141. SAUNDER, B.R., (2004). On the Structure of Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel Particles. *Langmuir*, 20(10); 3925–3932.
142. PANDITHAGE, R., (2012). *Brief Introduction to Critical Point Drying*. Leica Microsystems.
143. (2009). *Technical Brief: Critical Point Drying*. Quorum Technologies Ltd.
144. MARMORAT, C., *et al.*, (2008). Cryo-imaging of hydrogels supermolecular structure. Brook University, New York.
145. DOMINGOS, R. F., *et al.*, (2009). Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology*, 43(19); 7277–7284.
146. HÖFLINGER, G., (2013). *Brief Introduction to Coating Technology for Electron Microscopy*. Leica Microsystems.
147. BOOTZ, A., *et al.* (2004). Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2); 369–375.
148. MAEDA, *et al.*, (2001). Effects of Ionization of Incorporated Imidazole Groups on the Phase Transitions of Poly(N-isopropylacrylamide), Poly(N,N-diethylacrylamide), and Poly(N-vinylcaprolactam) in Water. *Langmuir*, 17(22); 6855–6859.
149. MOLINA, M. J., *et al.*, (2004). Factors driving the protonation of poly(N-vinylimidazole) hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 42(12); 2294–2307.
150. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Book%3A_Physical_Chemistry_\(Fleming\)/9%3A_Chemical_Equilibria/9.4%3A_Degree_of_Dissociation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Book%3A_Physical_Chemistry_(Fleming)/9%3A_Chemical_Equilibria/9.4%3A_Degree_of_Dissociation)
151. KAWAGUCHI, S., *et al.* (1995). Surface Characterization and Dissociation Properties of Carboxylic Acid core-shell latex particle by potentiometric and conductometric titration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 176(2); 362-369.
152. MINAMI S., *et al.*, (2016). Rheological properties of suspensions of thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) microgels undergoing volume phase transition. *Physical Properties of Polymers*, 48; 1079-1085.
153. BERLI, C., *et al.*, (2000). Rheological Modeling of Microgel Suspensions Involving Solid-Liquid Transition. *Langmuir*, 16(21), 7968-7974.
154. LYKLEMA, J., (2005)., *Fundamentals of Interface and colloid science: Volume IV Particulate Colloids*. Elsevier.
155. KRIEGER, I. M., (1972). *Rheology of monodisperse latices*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 3(2): 111–136
156. KRIEGER, I. M., *et al.*, (1959). A Mechanism for Non-Newtonian Flow in Suspensions of Rigid Spheres. *Transactions of the Society of Rheology*, 3(1); 137–152.
157. SHEWAN, H. M., (2014). *Rheology of Soft Particle Suspensions*. The University of Queensland.
158. ROMEO, G., *et al.*, (2010). Temperature-Controlled Transitions Between Glass, Liquid, and Gel States in Dense p-NIPA Suspensions. *Advanced Materials*, 22(31); 3441–3445.
159. AINOLA, M., (2009). *Pannus invasion into cartilage and bone in rheumatoid arthritis*. Faculty of Medicine of the University of Helsinki; 13-28.
160. SHAJI, J., (2013). *Nanocarriers for targeting in inflammation*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(3); 3-12.
161. NOGUEIRA, E., (2015). *Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Article in press; 15.
162. WILDER, R. L., (2002). *Integrin alpha v beta 3 as a targeted for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61; ii96-ii99.

163. DOLEZALOVA, P. (2002). *Soluble adhesion molecules ICAM-1 and E-selectine in juvenile arthritis: Clinical and laboratory correlations*. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20; 249-254.
164. SHERMAN, L., *et al.* (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(5); 726-733.
165. LAURENT, T. C., *et al.* (1992). *Hyaluronan*. *The FASEB Journal*, 6(7); 2397-2494.
166. MERO, A., *et al.*, (2014). *Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules*. *Polymers*, 6(2); 346-369.
166. DONG, Q., *et al.* (2014). *Rapid determination of hyaluronic acid concentration in fermentation broth with near-infrared spectroscopy*. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 7(6); 145
167. ALYOUSSEF, J., *et al.*, (2002). *New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(4); 913-119.
167. LI, Q. *et al.*, (2018). *Hyaluronic Acid-Methotrexate Conjugates Coated Magnetic Polydopamine Nanoparticles for Multimodal Imaging-Guided Multistage Targeted Chemo-Photothermal Therapy*. *Molecular Pharmaceutics*, 15(9); 4049-4062.
168. SCOTT, J., *et al.*, (1991). *Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation*. *Biochemical Journal*, 274(3); 699-705.
169. SCHIRALDI, C., *et al.*, (2010). *Biotechnological Production and Application of Hyaluronan*. *Peptide Science*, 20
170. <http://biplot.usal.es/problemas/libro/6%20%20Regresion.pdf>
171. BORCHERS, A. T., *et al.*, (2004). *The use of methotrexate in rheumatoid arthritis*. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34(1); 465-483.
172. CRONSTEIN, B. N., (1996). *Molecular Therapeutics: Methotrexate and its mechanism of action*. *Arthritis and Rheumatism*, 39(12);1951-60
173. SCHNABEL, A., *et al.*, (1994). *Low-dose methotrexate in rheumatic diseases: efficacy, side effects, and risk factors for side effects*. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 23; 310-27.
174. ALARCÓN, G. S., *et al.*, (1989). *Methotrexate in rheumatoid arthritis. Toxic effects as the major factor in limiting long-term treatment*. *Arthritis and Rheumatism*, 32; 671-676.
175. RIDER, B. T., (2007). *Methotrexate*. Health Sciences Center, Elsevier Inc
176. (2011). *Product Monograph: Methotrexate*, Pfizer Canada Inc.
177. <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?ligandId=4815>
178. CIEKOT, J., *et al.*, (2012). *Methods for methotrexate determination in macromolecular conjugates drug carrier*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69 (6); 1342-1346.
179. WU, J., *et al.*, (2016). *Facile synthesis of magnetic-/pH-responsive hydrogel beads based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan hydrogel as MTX carriers for controlled drug release*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(15); 1553-1568
180. SIBEKO, B., *et al.*, (2012). *Composite Polylactic-Methacrylic Acid Copolymer Nanoparticles for the Delivery of Methotrexate*. *Journal of Drug Delivery*; 1-18.
181. RASOULI, S., *et al.*, (2014). *Synthesis, characterization and pH-controllable methotrexate release from biocompatible polymer/silica nanocomposite for anticancer drug delivery*. *Drug Delivery*, 21(3); 155-163.
182. NOVALES, A., (2010). *Análisis de Regresión*. Departamento de Economía Cunitativa. Universidad Complutense.
183. SIPS, R., (1948). *On the Structure of a Catalyst Surface*. *The Journal of Chemical Physics*, 16(5): 490-495.
184. QUIÑONES, I., *et al.*, (1998). *Extension of a Jovanovic-Freundlich isotherm model to multicomponent adsorption on heterogeneous surfaces*. *Journal of Chromatography A*, 796(1); 15-40.
185. AYAWEI, N., *et al.*, (2017). *Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms*. *Journal of Chemistry*; 1-11.
186. TZABAR, N., *et al.*, (2016). *Adsorption isotherms and Sips models of nitrogen, methane, ethane, and propane on commercial activated carbons and polyvinylidene chloride*, *Adsorption*, 22(7); 901-914.

Capítulo 10. Anexos

Anexo 1. ANOVA para determinar el efecto del volumen de reacción para la síntesis de nanogeles en su d_H

Tabla 42. Tratamientos y simbología de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

Tratamiento	Media de réplicas de d_H
20 mL	\bar{X}_A
200 mL	\bar{X}_B
500 mL	\bar{X}_C

Tabla 43. Parámetro de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C$	1	0.05

Tabla 44. ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_o
Tratamiento	485.13	2	242.57	1.07806
Residuo	1350.01	6	225.00	
Total	1835.14	8		

Tabla 45. Conclusiones de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

F_o	F_c	Conclusión
1.07806	5.14	Con un 95% de confianza; acepta H_0 , lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que no existen diferencias significativas en el d_H de las partículas de nanogel al variar el volumen de reacción para su síntesis

Anexo 2. ANOVA para determinar el efecto del volumen de reacción para la síntesis de nanogeles en su PDI

Tabla 46. Tratamientos y simbología de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

Tratamiento	Media de réplicas de PDI
20 mL	\bar{X}_A
200 mL	\bar{X}_B
500 mL	\bar{X}_C

Tabla 47. Parámetro de ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C$	1	0.05

Tabla 48. ANOVA para diferencia en d_H al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	0.0538	2	0.0269	7.9638
Residuo	0.0203	6	0.0034	
Total	0.0741	8		

Tabla 49. Conclusiones de ANOVA para diferencia en PDI al variar el volumen de reacción para la síntesis de nanogeles

F_0	F_c	Conclusión
7.9638	5.14	Con un 95% de confianza; se rechaza H_0 , lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas en el PDI de las partículas de nanogel al variar el volumen de reacción para su síntesis

Anexo 3. ANOVA de dos vías para determinar el efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH

Tabla 50. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH

Tratamiento 1 (1VI), Tratamiento 2 (pH)	Media de réplicas de PDI
5% 1VI a pH=7	\bar{X}_A
5% 1VI a pH=5	\bar{X}_B
7.5% 1VI a pH=7	\bar{X}_C
7.5% 1VI a pH=5	\bar{X}_D
10% 1VI a pH=7	\bar{X}_E
10% 1VI a pH=5	\bar{X}_F
15% 1VI a pH=7	\bar{X}_G
15% 1VI a pH=5	\bar{X}_H

Tabla 51. Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH

Hipótesis verdadera (H ₀)	Hipótesis nula (H ₁)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F = \bar{X}_G = \bar{X}_H$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F \neq \bar{X}_G \neq \bar{X}_H$	1	0.05

Tabla 52. ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F _o
Tratamiento 1	93.75	3	31.26	5.08
Tratamiento 2	264.50	1	264.50	43.04
Residuo	18.44	3	6.15	
Total	367.69	7		

Tabla 53. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 2% de MBA a diferentes pH

F ₀₁	F _{c1}	F ₀₂	F _{c2}
5.08	9.28	43.04	10.13
Conclusión			
Con un 95% de confianza; se acepta H ₀ para tratamiento 1; y se rechaza H ₀ para tratamiento 2, lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que no existen diferencias significativas entre la LCST al utilizar esas proporciones de 1VI, pero sí hay diferencia al variar el pH.			

Anexo 4. ANOVA de dos vías para determinar el efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH

Tabla 54. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH

Tratamiento 1 (1VI), Tratamiento 2 (pH)	Media de réplicas de PDI
5% 1VI a pH=7	\bar{X}_A
5% 1VI a pH=5	\bar{X}_B
7.5% 1VI a pH=7	\bar{X}_C
7.5% 1VI a pH=5	\bar{X}_D
10% 1VI a pH=7	\bar{X}_E
10% 1VI a pH=5	\bar{X}_F
15% 1VI a pH=7	\bar{X}_G
15% 1VI a pH=5	\bar{X}_H

Tabla 55. Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH

Hipótesis verdadera (H ₀)	Hipótesis nula (H ₁)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F = \bar{X}_G = \bar{X}_H$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F \neq \bar{X}_G \neq \bar{X}_H$	1	0.05

Tabla 56. ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F _o
Tratamiento 1	111.75	3	37.25	3.61
Tratamiento 2	283.50	1	282.50	27.39
Residuo	18.44	3	6.15	
Total	367.69	7		

Tabla 57. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogeles con 5% de MBA a diferentes pH

F ₀₁	F _{c1}	F ₀₂	F _{c2}
3.61	9.28	27.39	10.13
Conclusión			
Con un 95% de confianza; se acepta H ₀ para tratamiento 1; y se rechaza H ₀ para tratamiento 2, lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que no existen diferencias significativas entre la LCST al utilizar esas proporciones de 1VI, pero sí hay diferencia al variar el pH			

Anexo 5. ANOVA de dos vías para determinar el efecto del porcentaje de MBA en la LCST de los nanogel con 5% de 1VI a diferentes pH

Tabla 58. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 5% de MBA a diferentes pH

Tratamiento 1 (1VI), Tratamiento 2 (pH)	Media de réplicas de PDI
2% MBA a pH=7	\bar{X}_A
2% MBA a pH=5	\bar{X}_B
5% MBA a pH=7	\bar{X}_C
5% MBA a pH=5	\bar{X}_D
10% MBA a pH=7	\bar{X}_E
10% MBA a pH=5	\bar{X}_F

Tabla 59. Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 5% de MBA a diferentes pH

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F$	1	0.05

Tabla 60. ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 5% de MBA a diferentes pH

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento 1	620.25	2	310.13	5.04
Tratamiento 2	1026.75	1	1026.75	16.69
Residuo	246.06	4	61.52	
Total	1893.06	7		

Tabla 61. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 5% de MBA a diferentes pH

F_{01}	F_{c1}	F_{02}	F_{c2}
5.04	6.94	16.69	7.71
Conclusión			
Con un 95% de confianza; se acepta H_0 para tratamiento 1; y se rechaza H_0 para tratamiento 2, lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que no existen diferencias significativas entre la LCST al utilizar esas proporciones de MBA, pero sí hay diferencia al variar el pH			

Anexo 6. ANOVA de dos vías para determinar el efecto del porcentaje de MBA en la LCST de los nanogel con 7.5% de 1VI a diferentes pH

Tabla 62. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 7.5% de MBA a diferentes pH

Tratamiento 1 (1VI), Tratamiento 2 (pH)	Media de réplicas de PDI
2% MBA a pH=7	\bar{X}_A
2% MBA a pH=5	\bar{X}_B
5% MBA a pH=7	\bar{X}_C
5% MBA a pH=5	\bar{X}_D
10% MBA a pH=7	\bar{X}_E
10% MBA a pH=5	\bar{X}_F

Tabla 63. Parámetro de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 7.5% de MBA a diferentes pH

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F$	1	0.05

Tabla 64. ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 7.5% de MBA a diferentes pH

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento 1	805.49	2	279.27	6.79
Tratamiento 2	1242.23	1	1242.23	30.20
Residuo	164.52	4	41.13	
Total	2212.25	7		

Tabla 65. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto del porcentaje de 1VI en la LCST de los nanogel con 7.5% de MBA a diferentes pH

F_{01}	F_{c1}	F_{02}	F_{c2}
6.79	6.94	30.20	7.71
Conclusión			
Con un 95% de confianza; se acepta H_0 para tratamiento 1; y se rechaza H_0 para tratamiento 2, lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que no existen diferencias significativas entre la LCST al utilizar esas proporciones de MBA, pero sí hay diferencia al variar el pH			

Anexo 7. ANOVA para determinar el efecto del porcentaje de MBA en su d_H

Tabla 66. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

Tratamiento (%MBA)	Media de réplicas de d_H
2	\bar{X}_A
7.5	\bar{X}_B
10	\bar{X}_C

Tabla 67. Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C$	1	0.05

Tabla 68. ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_o
Tratamiento	2968.26	2	1284.13	11.73
Residuo	759.31	6	126.55	
Total	3727.57	8		

Tabla 69. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

F_o	F_c	Conclusión
11.73	5.14	Con un 95% de confianza, se rechaza H_0 ; lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas en el d_H de las partículas de nanogel al variar el porcentaje de MBA utilizado.

Anexo 8. ANOVA para determinar el efecto del porcentaje de MBA en su PDI

Tabla 70. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

Tratamiento (%MBA)	Media de réplicas de d_H
2	\bar{X}_A
7.5	\bar{X}_B
10	\bar{X}_C

Tabla 71. Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C$	1	0.05

Tabla 72. ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_o
Tratamiento	0.003459	2	0.001730	0.3196
Residuo	0.032468	6	0.005411	
Total	0.035927	8		

Tabla 73. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

F_o	F_c	Conclusión
0.3196	5.14	Con un 95% de confianza, se Acepta H_0 ; lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que no existen diferencias significativas en el PDI de las partículas de nanogel al variar el porcentaje de MBA utilizado.

Anexo 9. ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH

Tabla 74. Tratamientos y simbología de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH

Tratamiento 1 (Temperatura), Tratamiento 2 (pH)	Media de réplicas de PDI
25°C a pH=7	\overline{X}_A
25°C a pH=5	\overline{X}_B
30°C a pH=7	\overline{X}_C
30°C a pH=5	\overline{X}_D
40°C a pH=7	\overline{X}_E
40°C a pH=5	\overline{X}_F
45°C a pH=7	\overline{X}_G
45°C a pH=5	\overline{X}_H
50°C a pH=7	\overline{X}_I
50°C a pH=5	\overline{X}_J

Tabla 75. Parámetro de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\overline{X}_A = \overline{X}_B = \overline{X}_C = \overline{X}_D = \overline{X}_E$ $= \overline{X}_F = \overline{X}_G = \overline{X}_H$ $= \overline{X}_I = \overline{X}_J$	$\overline{X}_A \neq \overline{X}_B \neq \overline{X}_C \neq \overline{X}_D \neq \overline{X}_E$ $\neq \overline{X}_F \neq \overline{X}_G \neq \overline{X}_H$ $\neq \overline{X}_I \neq \overline{X}_J$	1	0.05

Tabla 76. ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento 1	112259.024	5	22451.805	4.24
Tratamiento 2	137779.352	1	127779.352	24.14
Residuo	37050.171	7	5292.882	
Total	277088.547	13		

Tabla 77. Conclusiones de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el d_H de los nanogeles al variar el pH

F_{01}	F_{c1}	F_{02}	F_{c2}
4.24	3.03	24.14	4.67
Conclusión			
Con un 95% de confianza; se rechaza H_0 para los tratamientos 1 y 2, lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas entre el d_H del nanogel al variar la temperatura y el pH			

Anexo 10. ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH

Tabla 78. Tratamientos y simbología de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH

Tratamiento 1 (Temperatura), Tratamiento 2 (pH)	Media de réplicas de PDI
25°C a pH=7	\bar{X}_A
25°C a pH=5	\bar{X}_B
30°C a pH=7	\bar{X}_C
30°C a pH=5	\bar{X}_D
40°C a pH=7	\bar{X}_E
40°C a pH=5	\bar{X}_F
45°C a pH=7	\bar{X}_G
45°C a pH=5	\bar{X}_H
50°C a pH=7	\bar{X}_I
50°C a pH=5	\bar{X}_J

Tabla 79. Parámetro de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH

Hipótesis verdadera (H ₀)	Hipótesis nula (H ₁)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E$ $= \bar{X}_F = \bar{X}_G = \bar{X}_H$ $= \bar{X}_I = \bar{X}_J$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E$ $\neq \bar{X}_F \neq \bar{X}_G \neq \bar{X}_H$ $\neq \bar{X}_I \neq \bar{X}_J$	1	0.05

Tabla 80. ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F _o
Tratamiento 1	0.05989	5	0.01196	3.11
Tratamiento 2	0.05842	1	0.058427	15.14
Residuo	0.02699	7	0.003856	
Total	0.1453	13		

Tabla 81. Conclusiones de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la temperatura en el PDI de los nanogeles al variar el pH

F ₀₁	F _{c1}	F ₀₂	F _{c2}
3.11	3.03	15.14	4.67
Conclusión			
Con un 95% de confianza; se rechaza H ₀ para los tratamientos 1 y 2, lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas entre el PDI del nanogel al variar la temperatura y el pH			

Anexo 11. ANOVA para determinar el efecto de la [HA] en el d_H de nos nanogeles recubiertos

Tabla 82. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

Tratamiento ([HA])	Media de réplicas de d_H
0.1	\bar{X}_A
0.25	\bar{X}_B
0.4	\bar{X}_C
0.5	\bar{X}_D
1	\bar{X}_E
1.5	\bar{X}_F

Tabla 83. Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F$	1	0.05

Tabla 84. ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	458577506	5	91715501	8.01
Residuo	137401500	12	11450125	
Total	595979006	17		

Tabla 85. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su d_H

F_0	F_c	Conclusión
8.01	4.39	Con un 95% de confianza, se rechaza H_0 ; lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas entre el d_H del nanogel recubierto al variar la [HA] usada.

Anexo 12. ANOVA para determinar el efecto de la [HA] en el PDI de nos nanogeles recubiertos

Tabla 86. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI

Tratamiento ([HA])	Media de réplicas de d_H
0.1	\bar{X}_A
0.25	\bar{X}_B
0.4	\bar{X}_C
0.5	\bar{X}_D
1	\bar{X}_E
1.5	\bar{X}_F

Tabla 87. Parámetro de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F$	1	0.05

Tabla 88. ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	0.5001	5	0.100013	10.13
Residuo	0.1184	12	0.009873	
Total	0.6185	17		

Tabla 89. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de porcentaje de MBA en su PDI

F_0	F_c	Conclusión
8.01	3.11	Con un 95% de confianza, se rechaza H_0 ; lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas entre el PDI del nanogel recubierto al variar la [HA] usada.

Anexo 13. Curva de calibración de MTX sódico en agua

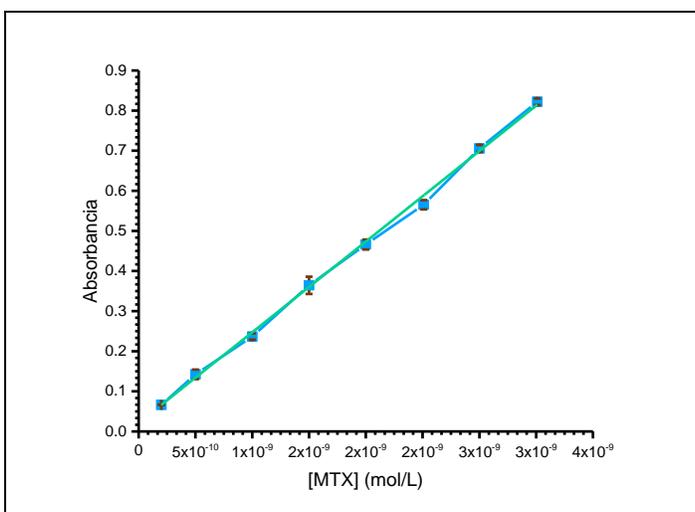


Figura 87. Curva de calibración de MTX sódico en agua considerando una absorción máxima en 302.18 nm

Tabla 90. Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de MTX sódico en agua

$Absorbancia = 225772 \frac{L}{mol} [MTX] + 0.0191$	
Intercepto	0.0191
Pendiente	225772 L/mol
R²	0.9984

Anexo 14. ANOVA para determinar el efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido

Tabla 91. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido

Tratamiento ([HA])	Media de réplicas de d_H
1: 0.1	\bar{X}_A
1: 0.25	\bar{X}_B
1: 0.5	\bar{X}_C
1: 1	\bar{X}_D
1: 2	\bar{X}_E
1: 4	\bar{X}_F

Tabla 92. Parámetro de ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D = \bar{X}_E = \bar{X}_F$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D \neq \bar{X}_E \neq \bar{X}_F$	1	0.05

Tabla 93. ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	4180.63	5	836.13	5530.33
Residuo	1.81	12	0.1511	
Total	4182.45	17		

Tabla 94. Conclusiones de ANOVA para determinar efecto de la proporción nanogel: MTX en el porcentaje de MTX adsorbido

F_0	F_c	Conclusión
5530.33	3.11	Con un 95% de confianza, se rechaza H_0 ; lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas entre el la proporción nanogel: MTX y el porcentaje de adsorción del MTX.

Anexo 15. ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta

Tabla 95. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta

Tratamiento (Sistema)	Media de réplicas de d_H
Nanogel NV7.5 22	\bar{X}_A
Nanogel NV7.5 22 recubierto	\bar{X}_B
Nanogel NV7.5 22 recubierto con MTX	\bar{X}_C

Tabla 96. Parámetro de ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C$	1	0.05

Tabla 96. ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	2295.10	2	1147.55	86.57
Residuo	79.53	6	13.26	
Total	2374.63	8		

Tabla 97. Conclusiones de ANOVA para determinar el efecto del sistema en el potencial zeta

F_0	F_c	Conclusión
86.57	5.14	Con un 95% de confianza; rechaza H_0 , lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas en el d_H de las partículas de nanogel al variar el volumen de reacción para su síntesis

Anexo 16. Curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 0.1 M

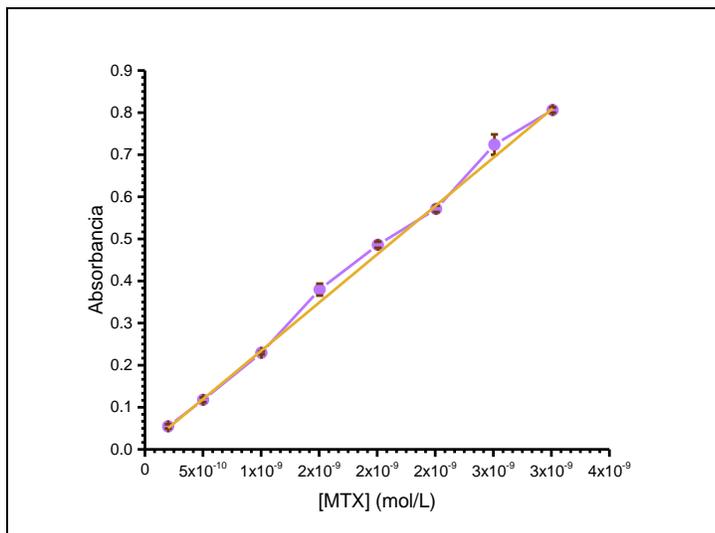


Figura 88. Curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 0.1 M, considerando una absorbancia máxima en 307.11 nm

Tabla 98. Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 0.1 M

$$Absorbancia = 231347 \frac{L}{mol} [MTX] + 0.00910$$

Intercepto	0.00910
Pendiente	231347 L/mol
R²	0.9967

Anexo 17. Curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de citratos (C₆H₈O₇/ Na₃C₆H₅O₇) 0.1 M.

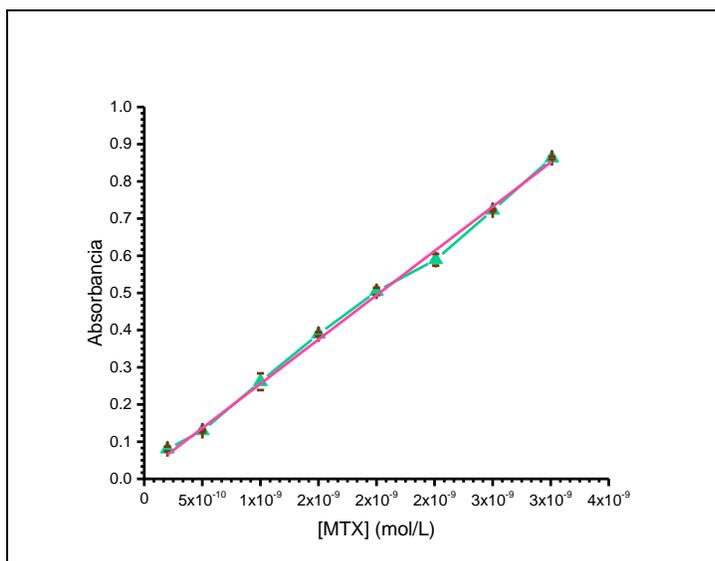


Figura 89. Curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de citratos (C₆H₈O₇/ Na₃C₆H₅O₇) 0.1 M, considerando una absorbancia máxima en 302.01 nm

Tabla 99. Ecuación y parámetros de linealización de la curva de calibración de MTX sódico en disolución amortiguadora de citratos (C₆H₈O₇/ Na₃C₆H₅O₇) 0.1 M

$$Absorbancia = 234468 \frac{L}{mol} [MTX] + 0.0249$$

Intercepto	0.0249
Pendiente	234468 L/mol
R²	0.9976

Anexo 18. ANOVA para determinar el efecto del medio en parámetro F del modelo Peppas-Sahlin

Tabla 100. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo *Peppas-Sahlin*

Tratamiento (Medio)	Media de réplicas de d_H
Medio 1	\bar{X}_A
Medio 2	\bar{X}_B
Medio 3	\bar{X}_C
Medio 4	\bar{X}_D

Tabla 101. Parámetro de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo *Peppas-Sahlin*

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D$	1	0.05

Tabla 102. ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo *Peppas-Sahlin*

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	1193.54	3	397.85	1597789.6
Residuo	0.00192	8	0.000294	
Total	1193.55	11		

Tabla 103. Conclusiones de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo *Peppas-Sahlin*

F_0	F_c	Conclusión
1597789.6	4.07	Con un 95% de confianza; se rechaza H_0 , lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas en el parámetro F del modelo <i>Peppas-Sahlin</i> al variar el medio

Anexo 19. ANOVA para determinar el efecto del medio en parámetro R del modelo Peppas-Sahlin

Tabla 104. Tratamientos y simbología de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro R del modelo *Peppas-Sahlin*

Tratamiento (Medio)	Media de réplicas de d_H
Medio 1	\bar{X}_A
Medio 2	\bar{X}_B
Medio 3	\bar{X}_C
Medio 4	\bar{X}_D

Tabla 105. Parámetro de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro F del modelo *Peppas-Sahlin*

Hipótesis verdadera (H_0)	Hipótesis nula (H_1)	Direccionalidad	α
$\bar{X}_A = \bar{X}_B = \bar{X}_C = \bar{X}_D$	$\bar{X}_A \neq \bar{X}_B \neq \bar{X}_C \neq \bar{X}_D$	1	0.05

Tabla 106. ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro R del modelo *Peppas-Sahlin*

	Suma de cuadrados (SC)	Grados libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F_0
Tratamiento	429.23	3	143.08	119947.70
Residuo	0.009542	8	0.001193	
Total	429.24	11		

Tabla 107. Conclusiones de ANOVA para determinar el efecto del medio en el parámetro R del modelo *Peppas-Sahlin*

F_0	F_c	Conclusión
119947.70	4.07	Con un 95% de confianza; se rechaza H_0 , lo cual quiere decir que hay evidencia para afirmar que existen diferencias significativas en el parámetro R del modelo <i>Peppas-Sahlin</i> al variar el medio