



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

Instituto de Ciencias Nucleares

## **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANO- Y MACRO- GELES DE QUITOSANO INJERTADOS CON N-VINILCAPROLACTAMA MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA COMO POTENCIALES ACARREADORES DE FÁRMACOS.”**

### **T E S I S**

Que para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

Presenta:

**I.Q.I. Gloria Angélica Cruz Gómez**

Tutora principal:

**DRA. GUILLERMINA BURILLO AMEZCUA**

Instituto de Ciencias Nucleares ICN-UNAM

Miembros del comité tutorial:

**DR. EMILIO BUCIO CARRILLO**

Instituto De Ciencias Nucleares ICN-UNAM

**DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES**

Universidad Autónoma Metropolitana

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

mayo 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Macromoléculas del Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica del Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Parte de los resultados de esta investigación fueron presentados en el XXIV International Materials Research Congress que se llevó a cabo en la ciudad de Cancún, Quintana Roo, del 16 al 20 de Agosto de 2015.

## Jurado de tesis

**Dr. Rafael Herrera Nájera**

PRESIDENTE

Facultad de Química, UNAM

**Dra. Guillermina Burillo Amezcua**

PRIMER VOCAL

Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

**Dr. Marco Antonio Uresti Maldonado**

SEGUNDO VOCAL

Facultad de Química, UNAM

**Dr. Juan Carlos Ruíz Bucio**

TERCER VOCAL

Universidad Autónoma Metropolitana-Izt.

**Dra. Alejandra Ortega Aramburu**

SECRETARIA

Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

## Resumen

En el presente trabajo se muestra la síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano (*net*-CS) a escala nanoscópica (nanopartículas) y macroscópica (películas), los cuales fueron modificados al ser injertados con N-vinilcaprolactama (NVCL), mediante radiación gamma por método directo a través de una fuente de rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$ , con la finalidad de obtener un material con potenciales aplicaciones en el área biomédica, con respuesta estímulo-sensible a los cambios de pH, por la naturaleza del CS, y a la temperatura, gracias a la incorporación de la NVCL.

Se analizó el efecto que tuvo la dosis de radiación en el porcentaje de NVCL injertada sobre los hidrogeles macro y nano, en un intervalo de 1-20 kGy cuando se varió la concentración del monómero en ácido acético (20, 30 y 50 % v/v).

Los hidrogeles injertados (*net*-CS)-g-NVCL en ambas escalas fueron caracterizados por diversas técnicas, como son: espectroscopia de infrarrojo, análisis termogravimétrico y microscopía electrónica de barrido. Se realizaron complementariamente microscopías láser confocal para las películas y de microscopía de fuerza atómica para las nanopartículas.

Los ensayos de carga y liberación del fármaco 5-Fluorouracilo (5-FU) mostraron que los nanogeles absorbieron una mayor cantidad de 5-FU y de forma más rápida que los sistemas macro (4 h contra 8 h, respectivamente); mientras que, la liberación del mismo se llevó a cabo en 48 horas para las películas y en 2 horas para las nanopartículas. De esta forma se mostró que los sistemas podrían ser utilizados como acarreadores de fármacos.

## Abstract

This work presents the synthesis and characterization of Chitosan-based hydrogels at the nano- (nanoparticles) and macro- (films) scale, which were modified with a graft of N-vinylcaprolactam using gamma irradiation from a  $^{60}\text{Co}$  source by the direct method. The goal was to obtain a material with potential biomedical applications, and with a response to changes in pH and temperature due to Chitosan's nature and the NVCL graft, respectively.

The effect of the dose on the grafting percentage of the Chitosan-based hydrogels was studied in the 1-20 kGy dose range, varying the monomer concentrations (20, 30, 50 % v/v) in acetic acid.

The grafted hydrogels ((*net*-CS)-g-NVCL), of both size scales, were characterized by several techniques, such as: infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, and scanning electronic microscopy. In addition, complementary studies by confocal laser microscopy, for the grafted films, and atomic force microscopy, for the nanoparticles, were carried out.

The drug loading and release experiments showed that the grafted-nanogels exhibited a larger and faster loading of 5-Fluorouracyl in comparison to the grafted-films (4 hours versus 8 hours, respectively); whereas, the drug was released in up to 48 hours from the grafted-films, and 2 hours from the nanoparticles. Therefore, it was shown that the synthesized systems could be used as drug carriers.

## Agradecimientos

Agradezco a **CONACyT** por la beca otorgada durante mis estudios de maestría en el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales y el apoyo económico para la presentación de poster en el XXIV International Materials Research Congress en la Ciudad de Cancún.

De igual manera, al financiamiento otorgado al proyecto **DGAPA IN200214**.

De manera muy especial a la **Dra. Guillermina Burillo**, por su guía y pronta respuesta a mis dudas y solicitudes durante el desarrollo del proyecto, además de la calidad humana que la caracteriza.

A los **miembros del jurado** por el tiempo dedicado a la revisión y corrección del presente trabajo.

A la **Dra. Alejandra Ortega** por su disposición y toda la ayuda brindada.

Al personal de cómputo del ICN por el soporte técnico brindado: **Martín Villafuerte, Luis Miguel Váldez y Enrique Palacios**.

Al **M. en C. Benjamín Leal** y al **Fis. Francisco García** de la Unidad de Irradiación del ICN, por su apoyo en la realización de los experimentos.

A **todos los miembros del Laboratorio de Química de Radiaciones** en Macromoléculas, por hacer de mi estancia una buena experiencia.

Al **ICN** y a la **UNAM** por recibirme y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

## Dedicatoria

Con mucho afecto a mi familia, en la que nací y la que gustosamente que he elegido: mis **padres, hermano y amigos**. Agradezco todas las experiencias que hemos vivido juntos, cuando nos divertimos y cuando los momentos se han tornado difíciles.

A **Dios**.

A **Rosy y Rodolfo** por ser mis superhéroes y amarme incondicionalmente.

A **Quique** por hacerme la vida más divertida. =)

★ Gracias **Richie, Saúl, Iván y Marquiux**, porque me demuestran a diario que un joven puede construir el futuro que imaginó, aunque cueste mucho esfuerzo.

A **Tona**, por ser mi confidente y darme la libertad expresar mis sentimientos.

A **Jebús**, por escucharme y aconsejarme sabiamente.

A **Dani**, por creer siempre en mí.

A **Luisa, Fer y el otro Dani** por las noches de sushi y a ti **Vic** por las peleas en el lab.



**"Libres son quienes crean, no copian, y libres son quienes piensan, no obedecen. Enseñar es enseñar a dudar."**

*Eduardo Galeano.*

# ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	i
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Hipótesis.....	11
1.2. Objetivos.....	11
1.2.1. <i>Objetivo General</i> .....	11
1.2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	11
2. GENERALIDADES.....	13
2.1. Polímeros y copolímeros.....	13
2.1.1. <i>Síntesis y mecanismo de polimerización en cadena</i> .....	15
2.2. Biopolímeros.....	17
2.3. Polímeros inteligentes.....	18
2.3.1. <i>Respuesta a estímulos externos: temperatura y pH</i> .....	20
2.4. Hidrogeles.....	21
2.5. Quitosano (CS).....	22
2.5.1. <i>Características y aplicaciones</i> .....	24
2.6. N-vinilcaprolactama (NVCL).....	24
2.7. Radiación ionizante y su interacción con la materia.....	25
2.7.1. <i>Radiación gamma</i> .....	26
2.8. Efectos de la radiación ionizante sobre los polímeros: reticulación y degradación.....	28
2.9. Copolímero de injerto.....	29
2.9.1. <i>Injerto por radiación</i> .....	30
2.10. Los polímeros como sistemas acarreadores de fármacos.....	31
2.11. 5-Fluorouracilo (5-FU).....	32

2.12.	Emulsiones .....	33
2.13.	Técnicas de caracterización.....	34
2.13.1.	<i>Espectroscopia de infrarrojo</i> .....	34
1.1.1.	<i>Espectroscopia UV-VIS</i> .....	35
1.1.2.	<i>Dispersión de Luz Dinámica</i> .....	36
1.1.3.	<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	37
1.1.4.	<i>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</i> .....	37
1.1.5.	<i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i> .....	38
3.	Desarrollo Experimental .....	39
3.1.	Equipos y reactivos .....	39
3.1.1.	<i>Determinación de grupos desacetilados</i> .....	39
3.1.2.	<i>Tamaño de partícula mediante DLS</i> .....	40
3.1.3.	<i>Análisis termogravimétrico</i> .....	40
3.1.4.	<i>Espectroscopia FTIR-ATR</i> .....	40
3.1.5.	<i>Fuente de irradiación</i> .....	40
3.1.6.	<i>Espectroscopia UV-Vis</i> .....	40
3.1.7.	<i>Microscopía Láser Confocal</i> .....	40
3.1.8.	<i>Microscopía de Fuerza Atómica</i> .....	40
3.2.	Procedimiento experimental.....	41
3.3.	Síntesis de macrogeles ( <i>net-CS</i> ).....	42
3.3.1.	<i>Procedimiento de elaboración de películas de CS entrecruzado por el método de evaporación (net-CS)<sub>F</sub></i> .....	42
3.3.2.	<i>Procedimiento de elaboración de esferas por el método de coacervación-precipitación (net-CS)<sub>b</sub></i> .....	42
3.4.	Síntesis de los nanogeles ( <i>net-CS</i> ) <sub>n</sub> .....	43
3.4.1.	<i>Método I</i> .....	43
3.4.2.	<i>Método II</i> .....	44
3.4.3.	<i>Método III</i> .....	45
3.5.	Síntesis de copolímeros de injerto ( <i>net-CS</i> )-g-NVCL.....	46
3.5.1.	<i>Efecto de la dosis en el porcentaje de injerto</i> .....	46
3.5.2.	<i>Purificación del copolímero de injerto</i> .....	47
3.5.3.	<i>Cuantificación del porcentaje de injerto</i> .....	47
3.6.	Caracterización de los sistemas .....	47

3.6.1.	<i>Tamaño de partícula</i> .....	47
3.6.2.	<i>Cinética de hinchamiento</i> .....	48
3.6.3.	<i>Análisis termogravimétrico</i> .....	49
3.7.	Estudios de carga y cesión de 5-FU .....	49
3.7.1.	<i>Carga de 5-FU</i> .....	50
3.7.2.	<i>Liberación de 5-FU</i> .....	50
4.	Análisis de Resultados .....	51
4.1.	Síntesis de hidrogeles de CS .....	51
4.1.1.	<i>Mecanismo de formación de la red de CS (net-CS)</i> .....	51
4.1.2.	<i>Ventajas y desventajas de las redes obtenidas y elección de los hidrogeles para ser preparados</i> .....	54
4.2.	Síntesis del copolímero de injerto de NVCL sobre hidrogeles de CS [(net-CS)-g-NVCL] .....	55
4.2.1.	<i>Mecanismo de injerto</i> .....	55
4.2.2.	<i>Estudio del efecto de la dosis en el porcentaje de injerto</i> .....	60
4.2.3.	<i>Espectroscopia FT-IR</i> .....	62
4.3.	Caracterización .....	65
4.3.1.	<i>Determinación del tamaño de las nanopartículas de (net-CS)<sub>n</sub>-g-NVCL mediante DLS</i> .....	65
4.3.2.	<i>Estudios de hinchamiento</i> .....	66
4.3.3.	<i>Análisis termogravimétrico</i> .....	72
4.3.4.	<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i> .....	74
4.3.5.	<i>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</i> .....	75
4.3.6.	<i>Microscopía láser confocal</i> .....	76
4.4.	Ensayos de carga y liberación de 5-FU .....	77
4.4.1.	<i>Carga de 5-FU</i> .....	79
4.4.2.	<i>Liberación de 5-FU</i> .....	81
5.	CONCLUSIONES .....	83
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	84
	ANEXO I .....	91
	ANEXO II .....	93
	Resultados del Método II .....	93

Caracterización de las esferas de $(net-CS)_b$ .....	94
<i>Microscopía Óptica</i> .....	94
<i>Microscopía Láser Confocal</i> .....	95
<i>Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Fuerza Atómica</i> .....	96

## ABREVIATURAS

( <i>net</i> -CS)-g-NVCL	injerto de NVCL en la red de CS
<sup>137</sup> Cs	isótopo de Cesio 137
5-FU	5-Fluorouracilo
<sup>60</sup> Co	isótopo de Cobalto 60
<sup>60</sup> Ni	isótopo de Níquel 60
AcOH	ácido acético
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
ATR	Reflectancia Total Atenuada
CS	quitosano
CV	Coefficiente de Variación
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
EM	Espectro Electromagnético
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
EtOH	etanol
FR	Factor de Respuesta
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier
g	gramo
GA	glutaraldehído
h	hora

kGy	kiloGray
LCST	Temperatura Mínima de Solución Crítica o Temperatura Inferior de Solución Crítica
m	metro
M	molar
mBar	milibar
MeOH	metanol
MeV	mega electrón-Volt
mg	miligramo
mL	mililitro
NaOH	hidróxido de sodio
<i>net-CS</i>	red de quitosano (quitosano entrecruzado)
nm	nanómetro
NVCL	N-vinilcaprolactama
° C	grado Celsius
K	grado Kelvin
pH <sub>c</sub>	pH crítico
PNIPAAm	poli(N-isopropilacril amida)
PNVCL	poli(N-vinil caprolactama)
rpm	revoluciones por minuto
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
T <sub>c</sub>	temperatura crítica

TGA	Análisis Termogravimétrico
UCST	Temperatura Máxima de Solución Crítica
UV-VIS	ultravioleta visible
$\mu\text{m}$	micrómetro



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Definición esquemática de un polímero y su unidad monomérica .....	13
Figura 2. Tipos de copolímeros: a) ordenado al azar; b) alternado; c) en bloques; d) de injerto.	14
Figura 3. Paso de iniciación en la polimerización en cadena. ....	15
Figura 4. Paso de propagación en la polimerización en cadena. ....	16
Figura 5. Paso de terminación en la polimerización en cadena. ....	16
Figura 6. Representación de los polímeros inteligentes de acuerdo a su aspecto físico. ....	20
Figura 7. Estructura de la quitina y quitosano. ....	23
Figura 8. Conversión de la quitina a quitosano por tratamiento básico. ....	23
Figura 9. Estructura química de la NVCL y la PNVCL. ....	24
Figura 10. Representación del espectro electromagnético (EM). ....	26
Figura 11. Decaimiento radiactivo del $^{60}\text{Co}$ . ....	27
Figura 12. Efectos de la radiación con la materia. ....	28
Figura 13. Proceso de injerto por el método de preirradiación. ....	30
Figura 14. Proceso de injerto por el método de preirradiación oxidativa. ....	31
Figura 15. Proceso de injerto por el método directo. ....	31
Figura 16. Perfiles de liberación del principio activo en la sangre. ....	32
Figura 17. Estructura química de la pirimidina y algunos derivados. ....	33
Figura 18. Tipos de emulsión. ....	34
Figura 19. Representación de un elemento ATR con reflexión múltiple. ....	35
Figura 20. Componentes esenciales de un AFM. ....	38
Figura 21. Etapas del procedimiento experimental. ....	41
Figura 22. Formación la red de CS entrecruzado con GA ( <i>net-CS</i> ). ....	51
Figura 23. Mecanismo de formación de una base de Schiff. ....	53
Figura 24. . Reacción de polimerización de la NVCL iniciada por radiación gamma. ....	55
Figura 25. Mecanismo de radiólisis del CS en estado sólido. ....	57
Figura 26. Radicales primarios formados cuando el quitosano es expuesto a radiación ionizante. ....	58
Figura 27. Reacción de injerto de la NVCL y la red de CS. ....	59
Figura 28. Injerto de NVCL en macrogeles de CS en función de la dosis a diferentes concentraciones de NVCL. ....	60

Figura 29. Injerto de NVCL en nanogeles de CS en función de la dosis a diferentes concentraciones de NVCL.....	61
Figura 30. Espectros infrarrojo.....	64
Figura 31. Determinación del hinchamiento límite en agua destilada de los sistemas macro .....	67
Figura 32. Determinación del hinchamiento límite en agua de las nanopartículas.....	68
Figura 33. Determinación del pH crítico de los macrogeles.....	69
Figura 34. Determinación del pH crítico de las nanopartículas.....	70
Figura 35. Determinación de la LCST de los sistemas macro.....	71
Figura 36. Determinación de la temperatura crítica de las nanopartículas.....	72
Figura 37. Termogramas de los sistemas estudiados.....	73
Figura 38. Imágenes SEM de los macrogeles de quitosano.. .....	74
Figura 39. Imágenes SEM de nanogeles de quitosano.....	74
Figura 40. Micrografías de AFM de los nanogeles sintetizados.....	75
Figura 41. Imágenes 3D de las microscopías láser confocal de las películas de la red de quitosano .....	76
Figura 42. Representación esquemática de la carga y liberación del 5-FU en los sistemas sintetizados. ....	78
Figura 43. Perfil de carga de 5-FU en los macrogeles.....	79
Figura 44. Perfil de carga de las nanopartículas de CS.....	80
Figura 45. Perfil de liberación del fármaco 5-FU de las películas de CS (macrogeles).....	81
Figura 46. Perfil de liberación del fármaco 5-FU en nanogeles de $(net-CS)_n$ -g-NVCL.....	82
Figura 47. Curva de calibración del 5-FU en agua.....	91
Figura 48. Efecto Tyndall .....	94
Figura 49. Imágenes del microscopio óptico de los macrogeles de CS.....	95
Figura 50. Imágenes de microscopía láser confocal tomadas a macrogeles de CS.....	96
Figura 51. Imágenes de microscopía electrónica de barrido tomadas a macrogeles de CS.....	97
Figura 52. Imágenes de Microscopía Fuerza Atómica tomadas a macrogeles de CS. ....	97

# ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Tipos de estímulos a los que un polímero inteligente puede responder. ....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 2. Cantidades de disoluciones y disolventes utilizados para formar las emulsiones.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 3. Resultados del tamaño de partícula medidos por DLS para el Método I.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 4. Temperaturas de degradación características de los sistemas obtenidos.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 5. Análisis estadístico de los datos para el ajuste de la curva de 5-FU en disolución Buffer 7.4.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 6. Resultados del tamaño de partícula medido por DLS para el Método II.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 7. Resultados del tamaño de partícula medido por DLS para el Método III. ....</i>	<i>94</i>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Hipótesis

Se sintetizarán hidrogeles (nanopartículas y películas) que presentarán respuesta dual a estímulos externos, ya que, responderán a cambios en el pH debido a la naturaleza catiónica del quitosano (CS) así como a la temperatura gracias a la incorporación de N-vinilcaprolactama (NVCL). Dichos materiales serán candidatos para su uso en aplicaciones biomédicas (específicamente, farmacéuticas) debido a que podrán ser utilizados como agentes transportadores de fármacos. Se espera que el tamaño de los sistemas sintetizados influya en la rapidez de carga y cesión de los fármacos.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

Sintetizar geles de quitosano en forma de nanopartículas y películas (a escala nano y macro, respectivamente) para su modificación mediante el injerto de N-vinilcaprolactama por medio de radiación gamma y obtener de esta manera un sistema que posea propiedades estímulo-sensibles al pH y temperatura con potencial aplicación en la carga y liberación de fármacos.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones adecuadas para sintetizar hidrogeles de quitosano en escala nano y macro (nanopartículas y películas, respectivamente).
- Injertar NVCL en hidrogeles de quitosano entrecruzado mediante radiación gamma utilizando método directo.
- Evaluar el efecto de la dosis y concentración de monómero sobre el porcentaje de injerto en los hidrogeles.

- Caracterizar los geles en ambas escalas mediante SEM y AFM para analizar la morfología de su superficie, FTIR-ATR para su estructura química y TGA para evaluar su comportamiento frente a la temperatura. En el caso específico de los nanogeles confirmar tamaño de partícula por DLS.
- Determinar el valor de hinchamiento límite de los sistemas en agua (ambas escalas) y analizar la respuesta de los hidrogeles a estímulos externos como son el cambio de acidez en el medio y a la temperatura para obtener su pH y temperatura crítica, respectivamente.
- Comparar el perfil de carga y liberación de los sistemas en nano- y macro- escala con el fármaco 5-FU como modelo.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1. Polímeros y copolímeros

El mundo está compuesto de materiales de distinta naturaleza, por ejemplo: existen los metales, cuya importancia es tal, que marcó varias eras de la historia de la humanidad; están los materiales cerámicos, de los que se destacan sus propiedades térmicas; en épocas recientes resalta el uso de los polímeros, ya sean naturales o sintéticos, debido principalmente a sus notables aplicaciones en la industria electrónica (por ejemplo, PLEDs (Cambridge Display Technology, 2015)) y biomédica (tejidos e implantes inocuos) (Kulshrestha & Mahapatro, (Editores), 2008).

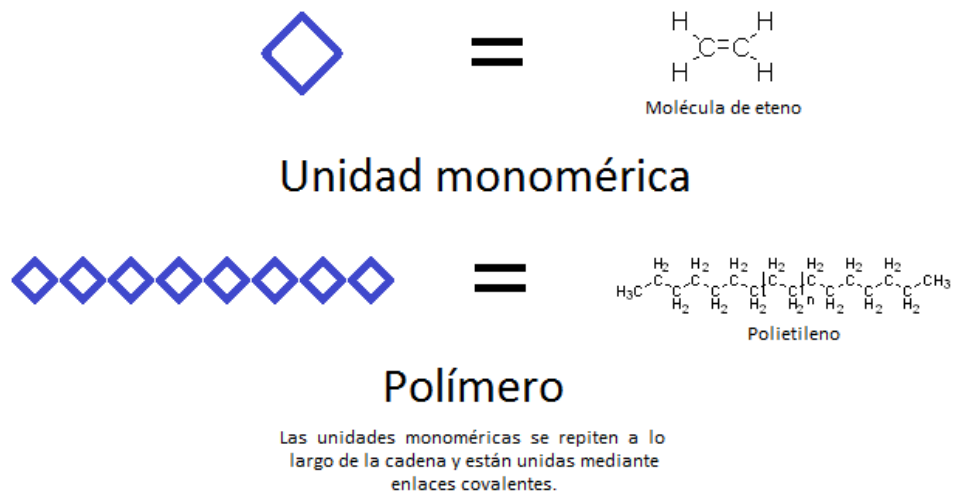
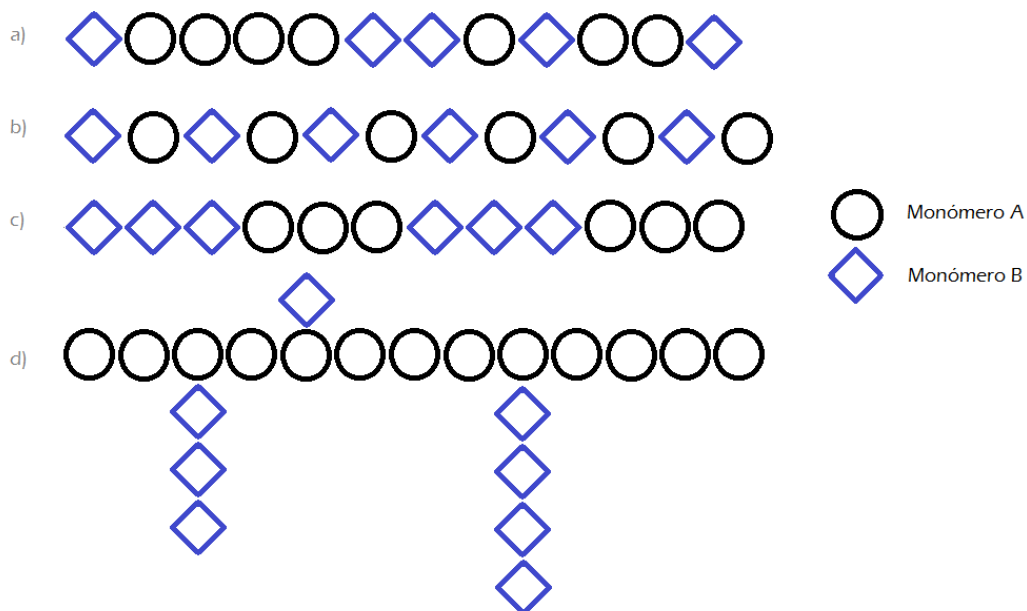


FIGURA 1. Definición esquemática de un polímero y su unidad monomérica

Los polímeros se definen clásicamente como macromoléculas compuestas de una o varias unidades monoméricas que se repiten a lo largo de la estructura química de forma aleatoria o siguiendo un patrón específico. En la Figura 1, se ilustra la estructura del Polietileno, el material del que se componen la mayoría de las bolsas de plástico, el cual proviene de la reacción de polimerización del etileno gas (monómero). El número de veces que la unidad repetitiva esté presente, y por tanto, la variación del peso molecular del polímero, determina el tipo de propiedades que el material presenta. La forma en que reacciona el monómero para formar el

polímero da lugar a la clasificación primaria introducida por Carothers: a) polímeros provenientes de una reacción de adición que siguen un mecanismo aniónico, catiónico o radicalario y presentan un crecimiento en cadena; b) polímeros resultado de una reacción de condensación entre monómeros bifuncionales donde su crecimiento se produce en etapas (Odian, 2004). Otra clasificación de los polímeros se tiene con base en su composición, si el polímero presenta solamente un monómero a lo largo de su estructura se denomina homopolímero, mientras que si el polímero se compone de varios monómeros, se dice que es un copolímero; es decir, un copolímero es la unión de varios polímeros en una sola macromolécula. Dependiendo del ordenamiento de los componentes del copolímero, pueden catalogarse como: copolímero al azar, alternado, en bloques y de injerto (Rudin, 1998; Odian, 2004). La Figura 2 muestra la disposición esquemática de un copolímero con las conformaciones antes mencionadas.



**FIGURA 2. Tipos de copolímeros: a) ordenado al azar; b) alternado; c) en bloques; d) de injerto.**

Si se observa la Figura 2, ejemplo d), puede apreciarse que un copolímero de injerto se compone de una cadena principal (monómero A, representado con ○) y posee cadenas de otro homopolímero a modo de ramificaciones a lo largo de su estructura (monómero B, representado con ◇).

### 2.1.1. Síntesis y mecanismo de polimerización en cadena

En general, la reacción de polimerización puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos: condensación y adición llamadas comúnmente polimerización por pasos y polimerización en cadena, respectivamente (Rudin, 1998). El primero se distingue porque se tienen dos especies bifuncionales que van dando lugar a dímeros, trímeros, tetrámeros, etc., de tal forma que el polímero (y por lo tanto el peso molecular) va creciendo paulatinamente; por otro lado, la polimerización en cadena se lleva a cabo en monómeros insaturados (que presentan enlaces vinílicos) y se caracteriza por la creación de sitios activos (radicales libres, cationes o aniones) que reaccionan tan rápidamente que el peso molecular se alcanza casi inmediatamente después de haber iniciado la reacción. En este mecanismo la formación del polímero conlleva tres etapas: iniciación, propagación y terminación, además de que es necesario la presencia de un iniciador químico o que exista una fuente de alta energía para que la reacción tenga lugar.

Los factores que determinan que la reacción proceda por vía radicalaria, aniónica o catiónica dependen principalmente del tipo de sustituyentes unidos al enlace vinílico, debido al efecto inductivo y resonante que estos ejercen en el monómero.

#### 2.1.1.1. Polimerización en cadena o poliadición

Como ya se mencionó, la poliadición o polimerización en cadena conlleva varias etapas, la primera de ellas es la iniciación; para el caso de mecanismo vía radicales libres, todo comienza cuando el agente iniciador se disocia formando las especies reactivas (paso 1.a, formación de radical primario) que atacarán a una molécula monomérica creando un sitio activo en ésta.

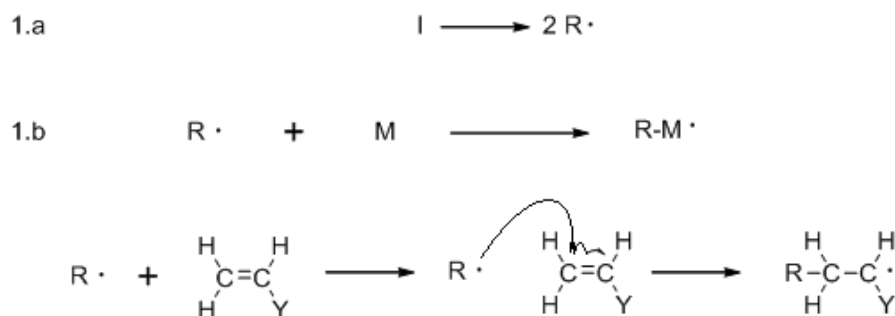


FIGURA 3. Paso de iniciación en la polimerización en cadena.

El segundo paso llamado propagación es precisamente el crecimiento de la cadena difundiendo el sitio activo de la siguiente forma (véase la Figura 4):



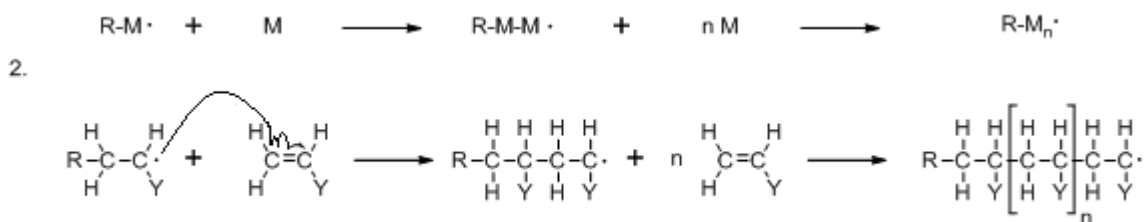


FIGURA 4. Paso de propagación en la polimerización en cadena.

Finalmente cuando dos sitios activos se encuentran y concluye de esta forma la reacción, se dice que el paso de terminación ocurre por combinación (paso 3.a). En menor medida puede ocurrir que la reacción finalice debido a que un hidrógeno  $\beta$  de un sitio activo se transfiera a otra macromolécula con sitio activo, teniendo así la una terminación por desproporción (paso 3.b). Usualmente lo que sucede es que se obtiene es una mezcla de ambos pasos en la etapa final del mecanismo de reacción.

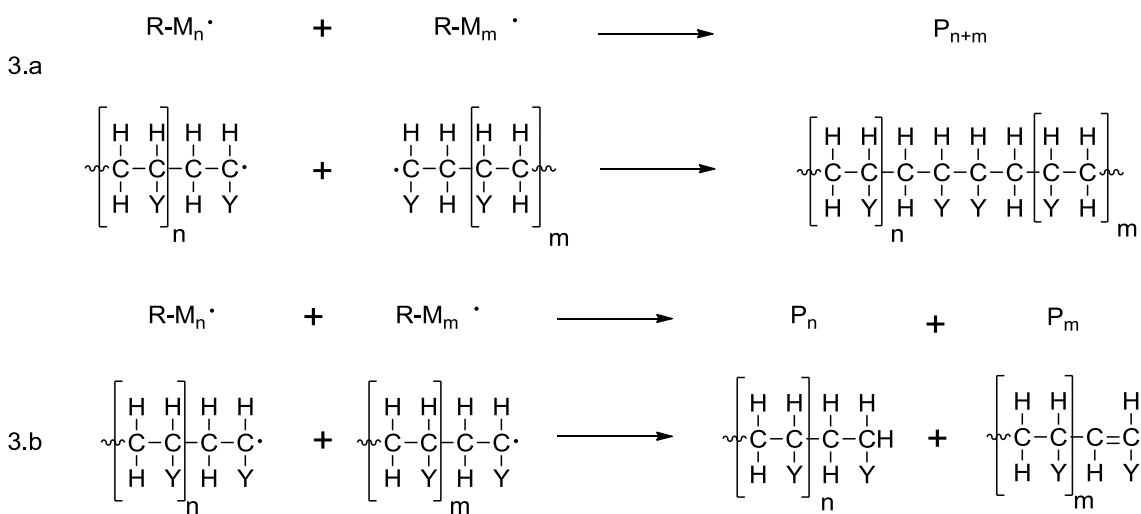


FIGURA 5. Paso de terminación en la polimerización en cadena. 3.a.-Terminación por combinación. 3.b- Terminación por desproporción.

Este mecanismo es el que rige la polimerización de injerto por radiación, al crear radicales libres para iniciar la reacción. No se requiere de un iniciador químico ya que la energía que proviene de la radiación es el que inicia la reacción.

## 2.2. Biopolímeros

Gracias a sus excelentes propiedades y a su bajo costo en comparación con las materias primas convencionales, los polímeros pudieron reemplazar rápidamente muchos artículos de la vida cotidiana e industrial, innovando en ciertos casos y dando lugar a lo que hoy en día se puede denominar la era de los polímeros. Sin embargo, el hecho de que en su mayoría provengan de recursos no renovables, que se requieran cientos de años para degradarse y que algunos de sus subproductos sean perjudiciales para el ambiente, ha dado lugar a la búsqueda de materiales alternativos que no presenten estas desventajas pero que conserven las propiedades de los polímeros derivados del petróleo.

Los biopolímeros son macromoléculas que han sido extraídas de fuentes naturales tales como la biomasa (polisacáridos y proteínas) o aquellos sintetizados por microorganismos (polihidroxialcanoatos o celulosa), razón por la cual suelen desintegrarse de manera más rápida y eficiente en el ambiente o en otros organismos vivos (como en el cuerpo humano), dando lugar a subproductos que generalmente se reintegran y no suelen ser tóxicos en el medio en el que se encuentran. También se consideran en esta clasificación a los polímeros sintéticos derivados del petróleo y monómeros provenientes de la biomasa que poseen compatibilidad con sistemas biológicos, tales como las policaprolactonas, poli(vinil alcohol), poli(ácido láctico), entre otros (U.S. Congress, 1993). Estas características los convierten en materiales con potenciales aplicaciones en la medicina y la industria alimenticia principalmente, aunque el costo de los hoy existentes es aún de 2 a 5 veces más elevado comparado con los materiales que en la actualidad se utiliza (U.S. Congress, 1993).

A continuación se enuncian algunos de los biopolímeros más importantes y su función:

- Ácidos nucleicos (ADN y ARN). Son copolímeros lineales compuestos de cuatro monómeros nucleótidos (una base nitrogenada unida mediante uno o más ácidos fosfóricos y una pentosa). Su importancia radica en que son portadores de la información genética en todos los organismos vivos.
- Proteínas/Polipéptidos. Sus monómeros son los aminoácidos de los cuales se conocen hasta 20 diferentes bloques. Cada proteína tiene una composición química específica con una forma tridimensional asociada. Participan como catalizadores biológicos; son los constituyentes de la lana, la seda, el cabello, tejido conectivo, toxinas y anticuerpos;

es decir, están involucradas en las funciones biológicas como la enzimática, de defensa, de movimiento, reguladora, reconocimiento de señales, hormonal, transporte, estructural, de defensa, etc.

- Polisacáridos. Están compuestos de azúcares simples llamados sacáridos, que son derivados aldehídicos o cetónicos de polihidroxicoholes de cadena recta (C>3). Pueden ser homopolímeros (celulosa, almidón, quitina) o copolímeros (glicosaminoglicanos, quitosano) compuestos por más de un glúcido. Estos polímeros participan en el almacenamiento de energía para el funcionamiento celular (almidón) o toman parte en las funciones estructurales como es el caso de la celulosa en las plantas.

### 2.3. Polímeros inteligentes

Un polímero se denomina "inteligente" si tiene la propiedad de responder con un cambio abrupto y reversible en sus propiedades físicas y/o químicas cuando su ambiente ha sido modificado ligeramente o en respuesta a un pequeño estímulo, por esta razón, estos materiales también se denominan "estímulo-sensibles".

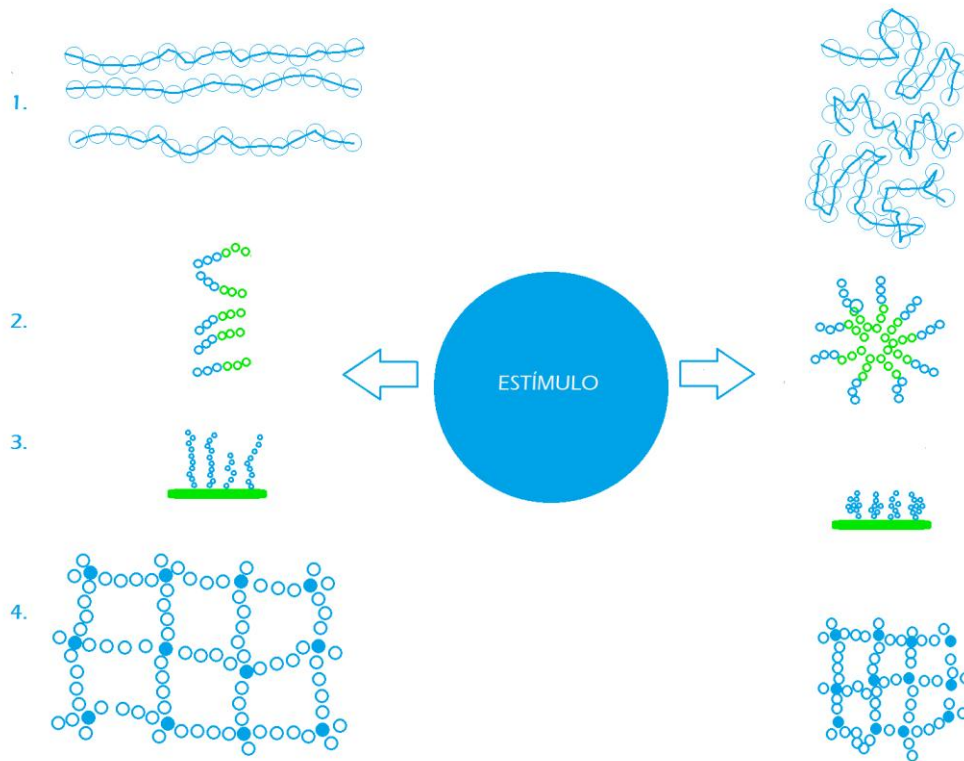
**Tabla 1. Tipos de estímulos a los que un polímero inteligente puede responder.**

<b>Tipos de estímulos</b>	<b>Físicos</b>	<b>Luz</b>
		<b>Temperatura</b>
		<b>Ultrasonido</b>
		<b>Campo magnético</b>
		<b>Campo eléctrico</b>
		<b>Mecánico</b>
	<b>Químicos</b>	<b>Disolvente</b>
		<b>Fuerza iónica</b>
		<b>Electroquímicos</b>
		<b>pH</b>
	<b>Biológicos</b>	<b>Reacciones enzimáticas</b>
		<b>Receptores de moléculas específicas</b>

Los estímulos a los que presentan una respuesta pueden ser de naturaleza química (cambios en el pH, fuerza iónica o un agente químico específico) o de naturaleza física (variación en la temperatura, campo eléctrico o magnético, estrés mecánico, entre otros) (Gil & Hudson, 2004; Kumaret. al, 2007). La Tabla 1 resume los tipos de estímulos a los que puede tener respuesta un polímero inteligente.

Atendiendo a su aspecto físico, estos polímeros pueden ser clasificados como (véase Figura 6):

1. Polímeros en disolución: se trata de polímeros que se unen gracias a interacciones físicas, puentes de hidrógeno o interacciones eléctricas, por lo que presentan una transición sol-gel. Estos polímeros precipitan en la disolución conforme la hidrofobicidad aumenta, formando una fase diferente, lo cual se logra ya sea reduciendo el número de enlaces por puente de hidrógeno o neutralizando las cargas eléctricas presentes en la red polimérica.
2. Micelas poliméricas: están formadas de una parte hidrofílica y otra hidrófoba ordenadas en bloques, los cuales responden al balance de estas fuerzas generalmente por cambios en la temperatura formando o deshaciendo las micelas; sin embargo, suelen confundirse con los geles reversibles ya que a una alta concentración, también presentan estado gel.
3. Polímeros adsorbidos o superficies injertadas: las superficies metálicas o poliméricas pueden ser modificadas en su superficie en el intento de que presenten una respuesta a un estímulo específico. La respuesta a tal estímulo dependerá de la longitud de la cadena y del área cubierta. Si la superficie y el polímero injertado o adsorbido son distinguibles, las propiedades de ambos generalmente se conservan sin mayores modificaciones.
4. Polímeros entrecruzados covalentemente: forman redes tridimensionales mediante la formación de enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas. Estas redes presentan hinchamiento en su estructura cuando están en presencia de disolventes afines a su carácter hidrofílico/hidrófobo, generalmente se encuentran en presencia de agua, formando lo que se conoce como hidrogeles. El entrecruzamiento se puede llevar a cabo gracias reacciones de adición, condensación, mediante el uso de radiación de alta energía o el uso de enzimas. (Akhtar, Hanif, & Ranjha, 2015, en prensa)



**FIGURA 6.** Representación de los polímeros inteligentes clasificados de acuerdo a su aspecto físico.

### 2.3.1. Respuesta a estímulos externos: temperatura y pH

En los últimos años, ha existido un notable interés por los sistemas que presentan respuesta tanto a cambios en la temperatura como en el pH que los rodea debido a sus potenciales usos en la biomedicina, ya que son parámetros presentes en los sistemas vivos. Los hidrogeles, micelas y demás, pueden presentar estas respuestas al medio.

Cuando el estímulo que promueve este hinchamiento/colapso del sistema es el incremento de la temperatura, se dice que los polímeros poseen una temperatura crítica. Si los polímeros se contraen a valores de temperatura por arriba de la temperatura crítica este valor se denomina temperatura crítica inferior de solución (LCST); si por el contrario se hinchan cuando son calentados encima de este valor crítico, entonces el polímero posee una temperatura crítica superior de solución (UCST). Los polímeros que poseen una temperatura crítica se caracterizan por poseer grupos moderadamente hidrofóbicos o una combinación hidrofóbica-hidrofílica en las partes que los componen. En los polímeros que presentan un comportamiento estímulo-respuesta del tipo LCST, se favorecen los puentes de hidrógeno entre las secciones hidrofílicas del polímero y el agua a bajas temperaturas, conforme la temperatura va aumentando, las

interacciones intermoleculares se ven disminuidas y se benefician las interacciones intramoleculares entre las partes hidrófobas, teniendo como resultado la contracción de la estructura polimérica (Samal et. al, 2014). Estos sistemas generalmente están constituidos por poli(acrilamidas N-sustituidas), poli(vinilalquilamidas) y poli(oligoetilen glicol (meta)acrilatos).

Por su parte, la respuesta de los hidrogeles al cambio de pH, depende de los grupos funcionales capaces de ionizarse que componen la estructura de la macromolécula. Estos polímeros se conocen como polielectrolitos: policationes, si su carga en disolución es positiva; polianiones, si ésta es negativa; polizwitteriónicos, si poseen grupos ionizables tanto positivos como negativos. Específicamente son llamados polianfolitos si las cargas se encuentran en diferentes unidades monoméricas, y polibetainos si los grupos cargados no son adyacentes y la parte catiónica no posee un hidrógeno asociado (Mah & Ghosh, 2013). El hinchamiento en este caso se debe fundamentalmente a las repulsiones electrostáticas entre las cargas presentes en la estructura, viéndose influenciado directamente por el pH del medio, la fuerza iónica y el tipo de contraiones presentes; por ejemplo, un polímero catiónico presentará hinchamiento aun por debajo de su  $pK_a$  debido a que existirá una gran cantidad de iones  $H^+$ , lo cual dará lugar a una gran repulsión electrostática entre las partes cargadas del polímero y este tenderá a hincharse e incrementar el espacio entre los grupos cargados, conforme el medio vaya disminuyendo la concentración de protones, es decir, se vuelva más básico, el polímero o hidrogel se irá colapsando debido a que ya no hay iones que promuevan su hinchamiento.

Los polianiones utilizados más frecuentemente junto con sus derivados son el poli(ácido acrílico) (PAAc), poli(ácido metacrílico) (PMAA), poli(dietilaminoetil metacrilato) (PDEAEMA) y algunos derivados del ácido fosfórico. Por su parte, el quitosano, la poli(etilenimina) (PEI), poli(dimetilamino-etil-metacrilato) (PDMAEMA) y la poli(amido amina) son algunos ejemplos de polímeros que se utilizan como policationes ya que contienen aminas primarias, secundarias y terciarias que se protonan a valores de pH ácido.

## 2.4. Hidrogeles

Los hidrogeles son polímeros provenientes de monómeros solubles en agua que al entrecruzarse (química o físicamente) forman redes tridimensionales. Al reticularse la solubilidad del material se pierde y, en su lugar, se transforman en sistemas capaces de retener una gran cantidad de agua en su estructura. Los grupos funcionales que le confieren esta capacidad son

altamente hidrofílicos tales como los alcoholes, ácidos carboxílicos y amidas (Mah & Ghosh, 2013). Son de gran interés porque los espacios que poseen podrían albergar fármacos o células. Actualmente son usados en el cultivo tridimensional de células y tejidos debido al alto contenido de agua ya que simulan el ambiente in vivo (Elisseeff, 2008; Buwalda et al., 2014).

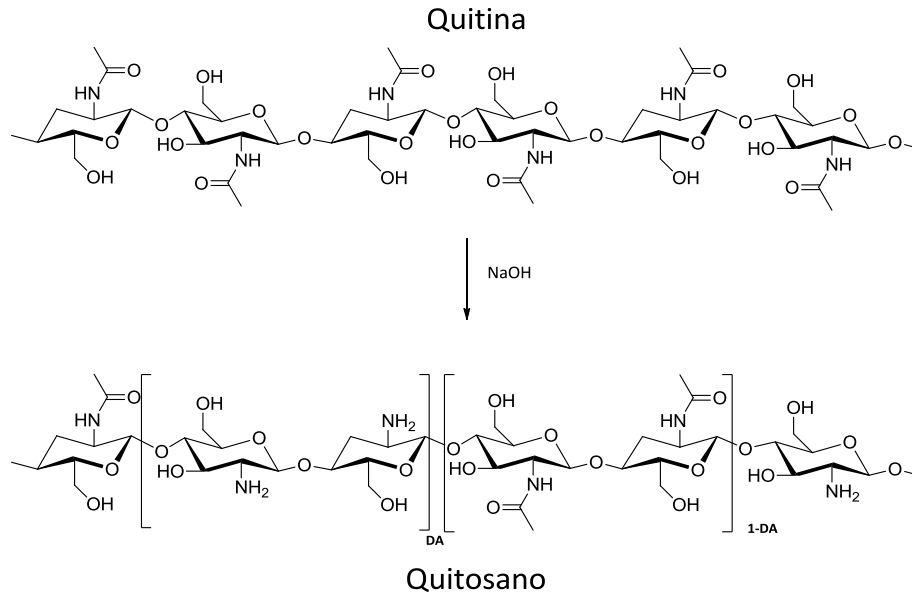
Desde una perspectiva cronológica, la primera referencia escrita del término hidrogel aparece a finales del siglo XIX cuando Bemmelen describe la formación cristalina de los óxidos de cobre cuando son puestos en contacto con el agua y cómo es que éstos la almacenan (Bemmelen, 1896). No obstante, fue hasta 1960 que Wichterle y Lim popularizaron el uso de hidrogeles al introducirlos en la vida cotidiana comercializando hidrogeles de poli(hidroxietil metacrilato) (pHEMA); es decir, los lentes de contacto blandos, los cuales fueron sintetizados vía radicales libres en disolución acuosa utilizando etilenglicol dimetacrilato como agente entrecruzante (Buwalda et al., 2014). A partir de entonces, la investigación en este campo ha sido muy amplia. En el periodo comprendido entre 1960 – 1980, los hidrogeles eran obtenidos a partir de polimerización en cadena de monómeros vinílicos solubles en agua, como es el caso del pHEMA, o por entrecruzamiento de polímeros hidrofílicos mediante la reacción de grupos funcionales o por radicales libres, en esta categoría se encuentran el alcohol de polivinilo (PVA) y el poli(etilen glicol) (PEG).

Para que un hidrogel sea catalogado como inteligente, debe poseer una respuesta dinámica con el medio para ser distinguido de los hidrogeles convencionales que poseen respuestas lentas generalmente (Samal et al., 2014). Cuando los polímeros entrecruzados, incapaces de disolverse, almacenan y desplazan agua de su estructura se dice que sufren una transición de fase volumétrica.

## 2.5. Quitosano (CS)

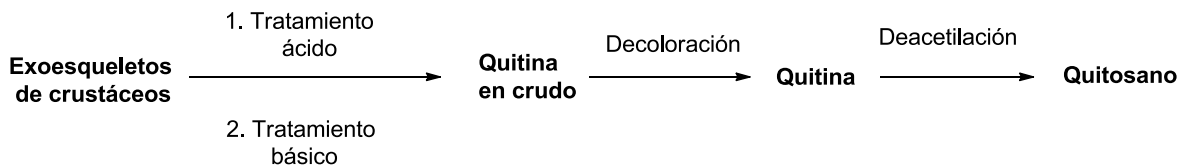
Antes de que los polímeros fueran sintetizados por el ser humano, éstos ya existían en la naturaleza; los polisacáridos, las proteínas y ácidos nucleicos son los ejemplos más comunes. La quitina (CA) o poli( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina) es un polímero de origen natural, el segundo más abundante en el planeta (10 mil millones de toneladas), y es biosintetizado por artrópodos, moluscos, hongos, levaduras y protozoarios esencialmente; el quitosano (CS) es uno de sus derivados más importantes, se caracteriza porque la estructura de la quitina ha sido parcialmente desacetilada; esto es, el grupo amida ha sido convertido a amina, y su porcentaje

de desacetilación debe ser igual o mayor a 60% para que presente solubilidad en un medio ácido (véase Figura 7).



**FIGURA 7. Estructura de la quitina y quitosano.**

El proceso de obtención del CS involucra el tratamiento de los exoesqueletos de los crustáceos para su desmineralización por medio de un tratamiento ácido y la eliminación de las proteínas presentes a través de un tratamiento básico, esto es seguido por lavados para su decoloración y finalmente la desacetilación se lleva a cabo con hidróxido de sodio (Figura 8). (Puvvada et al, 2012)



**FIGURA 8. Conversión Proceso de obtención del quitosano.**



### 2.5.1. Características y aplicaciones

Debido a la presencia de grupos amino, el quitosano es un polisacárido de naturaleza catiónica. Es insoluble en agua y disolventes orgánicos pero se solubiliza en ácidos como el acético, clorhídrico, nítrico, perclórico e hidropérlórico (de Alvarenga, 2011). Además de provenir de una fuente biológica, el quitosano también es fácilmente biodegradable, lo que según el Dr. Patrick B. Smith del Instituto Molecular de Michigan, lo clasifica como un biopolímero (Petrova, 2014). Asimismo, presenta actividad antimicrobiana, biocompatibilidad y no es tóxico, lo que lo hace ideal para la industria farmacéutica, biomédica, alimenticia e incluso cosmética (Goy, de Britto, & Assis, 2009; Yao, Li, Yao, & Yin (Editores), 2012).

## 2.6. N-vinilcaprolactama (NVCL)

Como parte de la familia de las N-alquilacrilamidas, la NVCL ha llamado la atención debido a que su monómero y su producto de polimerización, la PNVCCL, presenta respuesta inteligente a la temperatura (LCST). Al observar la estructura química de estas moléculas (Figura 9) se explica su carácter anfifílico, lo que la hace soluble en disolventes como agua (en temperaturas menores a 31 °C), alcoholes, DMF, DMSO, THF, p-dioxano, cloroformo y diclorometano (Cortez-Lemus & Licea-Claverie, 2015 en prensa).

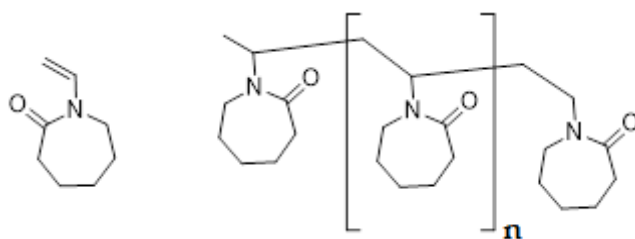


FIGURA 9. Estructura química de la NVCL y la PNVCL.

Debido a que posee una temperatura crítica inferior de solución (LCST) entre los 30 y 34°C, intervalo que se encuentra muy cercano a la temperatura fisiológica del cuerpo humano, es sumamente atractiva en aplicaciones biomédicas, por lo que es uno de los polímeros

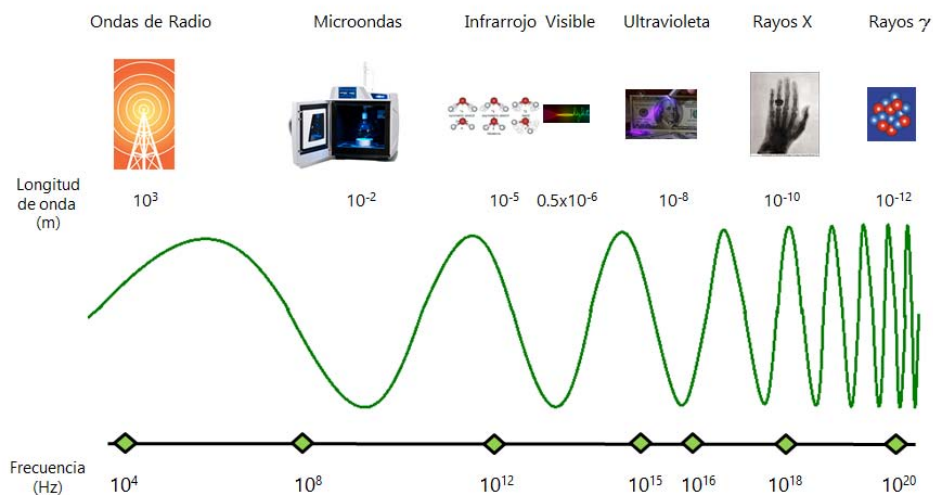
termosensibles más utilizados junto con la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). Comparada con el PNIPAAm, la PNVCL exhibe un comportamiento más estable frente a la hidrólisis, ya que sus productos de descomposición son moléculas con ácidos carboxílicos en vez de grupos amida como en el caso del PNIPAAm que resultan tóxicos y, por lo tanto, contraproducentes para los organismos vivos (Cortez-Lemus & Licea-Claverie, 2015 en prensa).

Entre las aplicaciones que se le han dado a este material se encuentran su uso en el encapsulamiento de células y enzimas, liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, extracción líquido-líquido para la separación de proteínas, como floculante, por mencionar algunas de las más importantes (Cortez-Lemus & Licea-Claverie, 2015 en prensa).

## 2.7. Radiación ionizante y su interacción con la materia

En 1864 James Clerk Maxwell sentó las bases de la teoría de la electricidad y el magnetismo que hasta entonces se pensaba no tenían relación. Se dio cuenta que, cuando una partícula cargada se mueve, induce un campo magnético y viceversa, al acelerarse, su comportamiento se describe a través de ondas, y por consiguiente fueron denominadas ondas electromagnéticas. Estas ondas se caracterizan por tener la misma velocidad que la de la luz en el vacío y son capaces de transportar energía (energía electromagnética). En 1887 Heinrich Hertz confirmó la teoría de Maxwell al reproducir este fenómeno en su laboratorio.

Las ondas electromagnéticas, que están constituidas por fotones, pueden describirse por su longitud o por su energía, las cuales varían inversamente una de la otra. El conjunto que contiene las ondas electromagnéticas se denomina espectro electromagnético (EM). En orden creciente de energía, las ondas estarían ordenadas de la siguiente forma: primero las ondas de radio que están seguidas por las de microondas, a continuación están las de infrarrojo (IR), luego las que conforman el espectro de luz visible, continuando con del ultravioleta (UV), los rayos X y finalmente, la radiación gamma. La Figura 10 es la representación del EM.



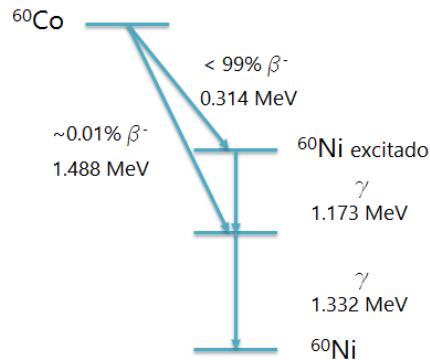
**FIGURA 10. Representación del espectro electromagnético (EM).**

Es posible observar que debido a la gran variedad de fuentes electromagnéticas, la materia interacciona con la radiación electromagnética. Como se mencionó anteriormente, la diferencia entre la radiación solar y la emitida por los modernos aparatos de comunicaciones, es simplemente la energía que cada una posee y como consecuencia su longitud de onda y frecuencia. Si las ondas emitidas poseen suficiente energía como para hacer que la materia desprenda electrones, se dice que dicha radiación es ionizante. La porción del EM que posee tal cantidad de energía comienza con la región del UV lejano, hasta los rayos gamma. Para fines del desarrollo de este proyecto, la importancia de la radiación ionizante radica en su capacidad de romper enlaces químicos que dan lugar a nuevos productos. No obstante, la radiación ionizante también puede ser producida por partículas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta^+$  y  $\beta^-$ ).

### 2.7.1. Radiación gamma

En 1900 Paul Villard y Henri Becquerel notaron que ciertos materiales radiactivos emitían radiación capaz de atravesar placas fotográficas blindadas incluso con 2 o 3 cm de plomo. Esta radiación que además no mostraba deflexión magnética, fue nombrada gamma ( $\gamma$ ) después de que Rutherford (1903) notó su similitud con los rayos X de Röntgen. Los rayos  $\gamma$  provienen del decaimiento espontáneo de núcleos radiactivos. Actualmente, las fuentes principales de radiación gamma son el  $^{60}\text{Co}$  y el  $^{137}\text{Cs}$  con una vida media de 5.24 años y 30 años, respectivamente. El primero es el más utilizado debido a que la energía emitida es mayor. El  $^{60}\text{Co}$  es un núclido que no se encuentra en la naturaleza, se obtiene al bombardear el  $^{59}\text{Co}$  con

neutrones térmicos. Decae a  $^{60}\text{Ni}$  por la emisión de dos negatrones y dos rayos gamma. La Figura 11 es la representación del decaimiento del  $^{60}\text{Co}$  (Navarrete & Cabrera, 1993).



**FIGURA 11. Decaimiento radiactivo del  $^{60}\text{Co}$ .**

Como ya se ha establecido, la radiación gamma posee alta energía y es, en consecuencia, ionizante. Cuando ésta interactúa con la materia ocurren tres fenómenos principales (Swallow, 1960):

- Efecto fotoeléctrico. Cuando un fotón de baja energía ( $<0.1$  MeV) choca con un átomo enlazado, el fotón incidente es absorbido por el átomo y desaparece, mientras que un electrón es expulsado (electrón Auger). Este efecto predomina cuando los átomos que reciben al fotón tienen núcleos ligeros.
- Efecto Compton. Conforme la energía de los fotones aumenta, la probabilidad de que la dispersión de Compton se presente también se incrementa. Un fotón de energía media (0.1 – 1 MeV) choca con un electrón libre y en reposo de un átomo enlazado, el fotón es dispersado en un ángulo  $\Theta$  respecto a la dirección de su trayectoria original y el electrón que fue golpeado es expulsado con energía cinética en otro ángulo diferente. Como consecuencia de la conservación de momento y energía, el fotón posee menos energía y momento que antes, ya que ha transferido parte de su energía al electrón. El efecto puede darse en prácticamente todos los núcleos y es el que predomina en la radiación  $\gamma$ .
- Producción de pares. Cuando la energía de los fotones incidentes es muy alta ( $>1.02$  MeV, energía equivalente a dos veces la masa del electrón), tiene lugar la transformación de la energía en dos partículas, un negatrón y un positrón, es decir, partículas  $\beta^-$  y  $\beta^+$ . Los negatrones ionizarán los átomos al arrancar electrones,

produciéndose así el par iónico, mientras que los positrones interactuarán con los electrones provocando la emisión de 2 rayos gamma de 0.51 MeV cada uno, lo que se conoce como radiación de aniquilación. Se puede producir si se trata de átomos con núcleos pesados.

Estos efectos se ilustran en la Figura 12.

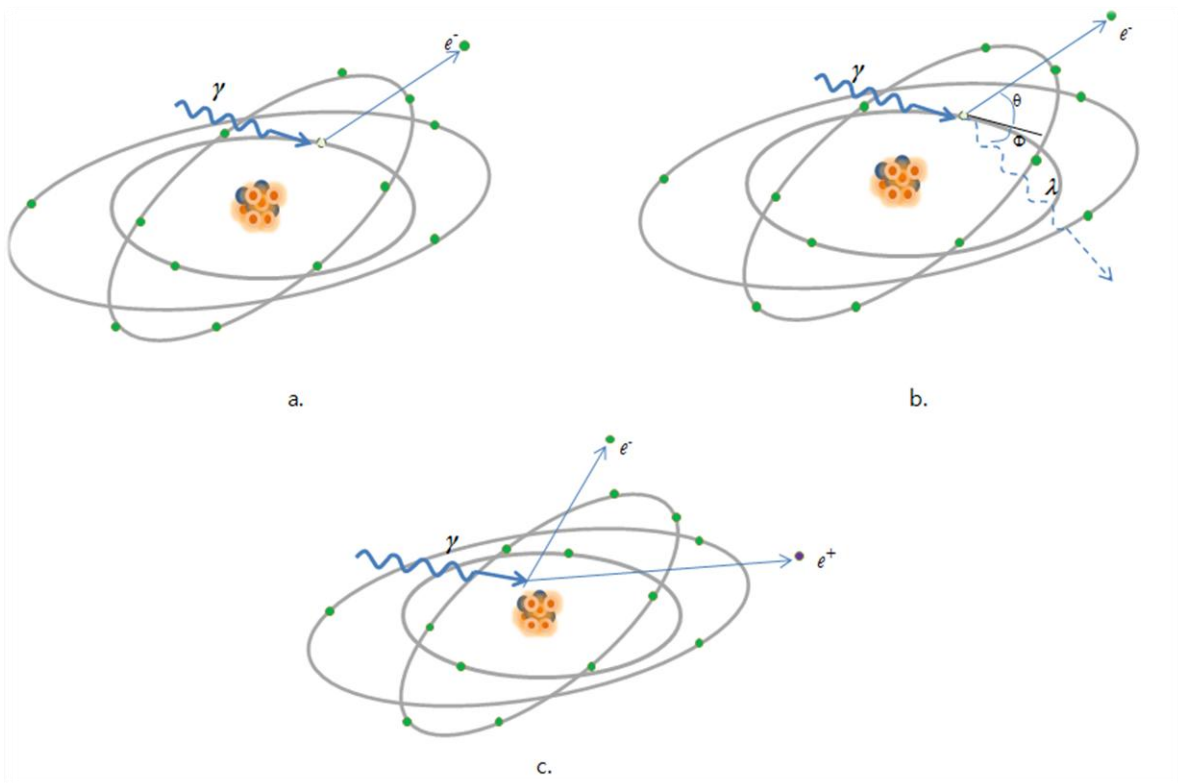


FIGURA 12. Efectos de la radiación con la materia. a. Efecto fotoeléctrico. b. Efecto Compton. c. Producción de pares.

## 2.8. Efectos de la radiación ionizante sobre los polímeros: reticulación y degradación

Uno de los cambios más importantes de la radiación ionizante, como es la gamma, sobre los polímeros es que puede aumentar o disminuir el peso molecular de estos (Chapiro, 1962).

Se habla de un incremento en su peso molecular debido a la formación de una estructura tridimensional (una red) del polímero, es decir, al entrecruzamiento de las cadenas que conforman la macromolécula a lo largo de las tres dimensiones. Por radiación, el

entrecruzamiento o reticulación se lleva a cabo entre los sitios activos del mismo polímero. Un polímero que ha sido reticulado es una macromolécula a la que no se puede determinar su peso molecular por los métodos convencionales, debido a que ya no es soluble en los disolventes habituales, sus propiedades térmicas y mecánicas han cambiado, habiendo aumentado de forma considerable su punto de fusión y perdido su solubilidad, sufriendo en su lugar hinchamiento.

El efecto de degradación es la ruptura del polímero, dando como resultado polímeros de bajo peso molecular y oligómeros dependiendo de la dosis de radiación a la que ha sido sometida el polímero.

Aunque ambos efectos suelen estar en competencia al momento de irradiar, si el número de entrecruzamientos formados por cada 100 eV absorbidos es mayor a un cuarto del número de cadenas rotas por 100 eV, entonces el efecto predominante será la formación de una red polimérica.

Otros efectos importantes de la radiación en los polímeros son la producción o eliminación de insaturaciones, formación de color y producción de gas.

## 2.9. Copolímero de injerto

Desarrollar un nuevo material es un largo y arduo proceso que implica su concepción, síntesis, caracterización e infinidad de pruebas que no aseguran que al final se obtenga lo que se planeó. En ocasiones, es más útil y sencillo en su lugar, modificar el material ya existente y mejorar sus propiedades, de forma tal que se conserven las más útiles y se perfeccionen las que son de nuestro interés.

En el caso de los polímeros, las modificaciones más comunes se obtienen al mezclar, curar o injertar las macromoléculas.

El injerto consiste en unir covalentemente un polímero B, formado por un monómero distinto al de la cadena principal de un polímero A. Para lograr esto, puede recurrirse a diferentes metodologías como son (Bhattacharya, Rawlins & Ray (Editores), 2009):

- Injerto iniciado por métodos químicos. Este puede llevarse a cabo por vía radicalaria o iónica, por lo que el papel del agente iniciador es fundamental.

- Injerto fotoquímico. El proceso se inicia debido a la presencia de un cromóforo que, al pasar a un estado excitado, sufre disociación y, por lo tanto, forma radicales libres, los que iniciarán el mecanismo de injerto. Si no se cuenta con el cromóforo en la estructura, es posible iniciar la reacción si se coloca un sensibilizador a la luz que favorezca la creación de los sitios reactivos.
- Injerto enzimático. La responsable de iniciar el proceso de copolimerización por injerto es la enzima. El proceso es relativamente reciente.
- Injerto inducido por plasma. Como en la radiación ionizante, los electrones acelerados tiene suficiente energía como para romper los enlaces químicos de las moléculas y dar lugar a la formación de macroradicales, para iniciar el proceso de injerto.
- Injerto por radiación. Este tipo de injerto se detallará a continuación.

### 2.9.1. Injerto por radiación

Es producido cuando la radiación de alta energía ioniza las moléculas de forma tal, que se rompen los enlaces de las mismas. Puede llevarse a cabo mediante la formación de radicales libres o por mecanismo iónico en donde se forma un ion polimérico que reacciona con el monómero. En el caso de que se formen radicales libres, puede llevarse a cabo por tres diferentes métodos (Chapiro, 1962; Swallow, 1960; Meléndez-Ortiz & Bucio, 2015):

- Preirradiación. Primero se irradia la matriz polimérica en vacío o en un medio inerte y posteriormente se añade el monómero a injertar. Es recomendable trabajar con temperaturas bajas para evitar la recombinación de radicales. Como ventaja que este método presenta se tiene la producción de poca cantidad de homopolímero (Figura 13).



FIGURA 13. Proceso de injerto por el método de preirradiación.

- Preirradiación oxidativa. Se irradia la matriz polimérica en presencia de oxígeno (generalmente en aire) lo que da lugar a la formación de grupos peróxidos e hidroperóxidos. Subsecuentemente, estos grupos se descomponen en sus respectivos radicales cuando la muestra irradiada es calentada y puesta en contacto con el monómero de interés. Presenta la ventaja de que sus intermediarios son muy estables e

incluso pueden ser almacenados para su posterior tratamiento, además de que las cantidades de homopolímero producidas son pequeñas (Figura 14).

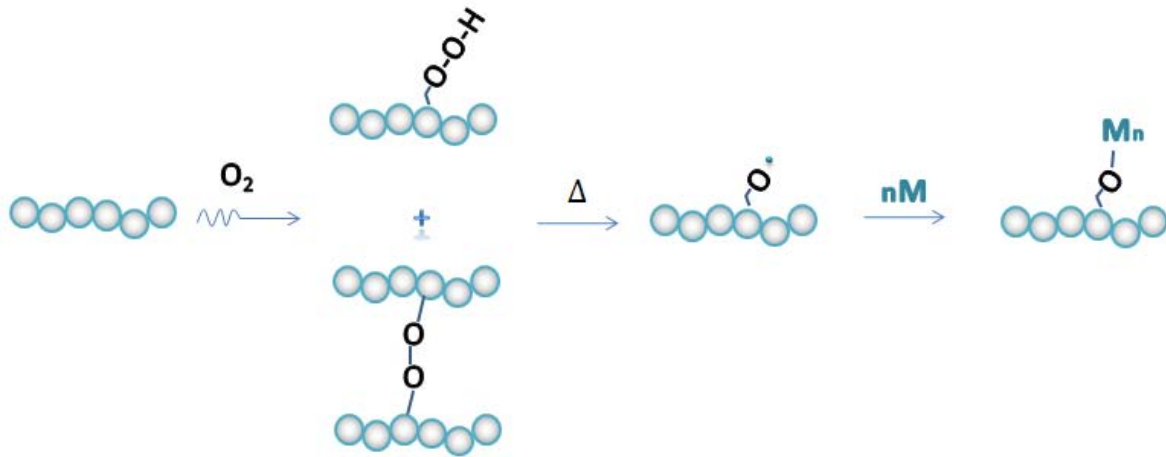


FIGURA 14. Proceso de injerto por el método de preirradiación oxidativa.

- c) Método directo. Se irradia el polímero y el monómero simultáneamente en una atmósfera inerte, por lo que se da lugar a la producción de homopolímero en el proceso de injerto. Es utilizado cuando los monómeros son poco reactivos o cuando se desea incrementar el porcentaje de injerto (Figura 15).



FIGURA 15. Proceso de injerto por el método directo.

## 2.10. Los polímeros como sistemas acarreadores de fármacos

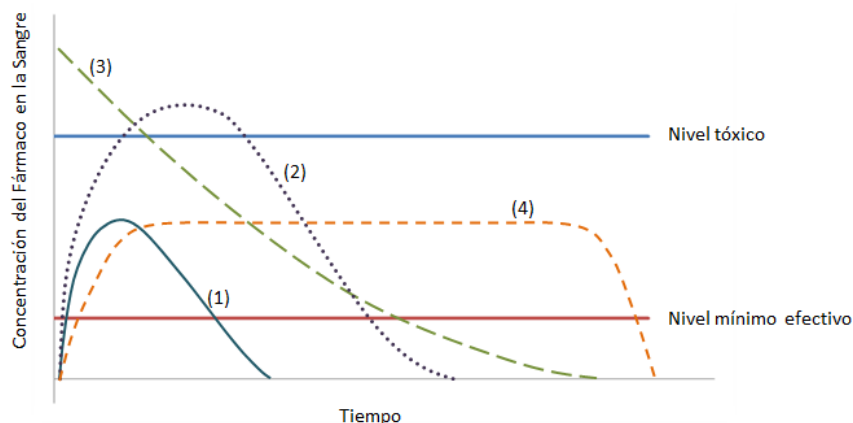
Cuando un fármaco es administrado en el organismo humano, su principal objetivo es que el principio activo llegue al sitio de interés y que su efecto sea máximo, de tal forma que el tratamiento vaya mejorando al paciente y se sufran los menos efectos secundarios.

Los sistemas poliméricos con respuesta inteligente son muy utilizados en la carga y liberación de fármacos ya que son capaces de hospedar drogas de naturaleza hidrófoba e hidrófila.

Los sistemas poliméricos pueden ser clasificados por su perfil de liberación como: sistemas monolíticos, donde el fenómeno de la difusión controla la cesión; sistemas activados por el



disolvente, donde la cesión es controlada por hinchamiento o presión osmótica; sistemas controlados químicamente, que generalmente son biodegradables, y sistemas activados por un agente externo (por ejemplo el pH y la temperatura). Generalmente, la cesión involucra más de un perfil de liberación (El-Nokaly, Piatt, & Charpentier (Editores), 1993).



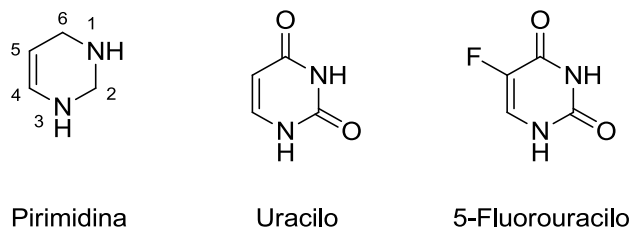
**FIGURA 16. Perfiles de liberación del principio activo en la sangre dependiendo de la forma de administración. (1) Dosis oral. (2) Sobredosis oral (3) Inyección (4) Sistema de liberación controlada.**

La Figura 16 muestra el comportamiento teórico de la concentración de fármaco al ser liberado en el plasma sanguíneo dependiendo de la forma de administración. La búsqueda de sistemas de liberación controlada se basa en el razonamiento que de esta forma se reducen los efectos secundarios y la droga actúa de forma más efectiva si la concentración se mantiene en un nivel óptimo (nivel terapéutico deseado) y constante por un prolongado periodo de tiempo(El-Nokaly, Piatt, & Charpentier (Editores), 1993). El término "liberación controlada" no sólo se refiere a una liberación lineal del principio activo, sino también, a que un estímulo externo pueda desencadenarla y no está determinado por una forma de administración específica.

## 2.11. 5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-Fluorouracilo (5-FU) o 5-Fluoro-1H-Pirimidin-2,4-diona es un medicamento antineoplásico que se comercializa con nombres como Fluoroplex, Efudex o Adrucil. Es un antimetabolito antagonista de la pirimidina, ya que su estructura es muy similar a la del uracilo, una base nitrogenada que forma parte del ARN con la única diferencia que el hidrógeno unido al carbono 5 es reemplazado por un flúor (véase Figura 17). Al ser un inhibidor metabólico nucleósido, inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos, y la actividad neoplásica, es decir, impide

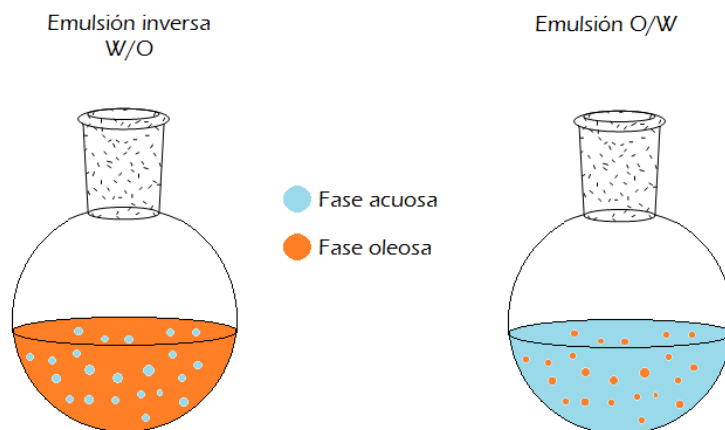
que las células se reproduzcan deteniendo el crecimiento del tumor(Norwegian Institute of Public Health, 2014; Longley, Harkin, & Johnston, 2003). Este medicamento se utiliza muy a menudo en la terapia contra el cáncer de mama, aparato digestivo (anal, esófago, pancreático y gástrico), hepático, cabeza y cuello, de piel de células basales y queratosis actínica, así como en cáncer colon-rectal.



**FIGURA 17. Estructura química de la pirimidina, uracilo y fluorouracilo, se aprecia la similitud entre sus estructuras.**

## 2.12. Emulsiones

Al hablar de emulsiones debe tenerse en cuenta que se hace referencia a un sistema coloidal; según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) se trata de un sistema compuesto de un medio donde se encuentran partículas dispersas con dimensiones, en al menos una de sus direcciones, que varían entre 1 nm y 1  $\mu\text{m}$  o a un sistema donde se tienen discontinuidades de ese orden. En el caso específico de una emulsión, tanto el medio como las partículas suspendidas son líquidos, aunque de manera general, las gotas dispersadas en el medio son de tamaños mayores a los señalados anteriormente. Las emulsiones más comunes son aquellas que suspenden partículas oleosas en un medio continuo acuoso y se denotan por O/W, si se trata del caso contrario, se denotan por W/O y se dice que se trata de una emulsión inversa. La Figura 18 ilustra el concepto de la emulsión W/O y la O/W.



**FIGURA 18. Tipos de emulsión.**

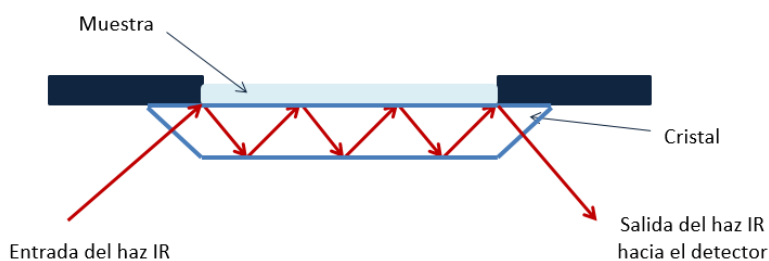
Debido a que termodinámicamente la energía interfacial tenderá a ser la mínima posible, las emulsiones suelen ser sistemas inestables; las partículas dispersadas frecuentemente tienden a coalescer, es decir, que las gotas suspendidas se agrupan progresivamente de manera que llegan a formar una fase diferente en la disolución, y se produce lo que se conoce como el rompimiento de la emulsión. Para disminuir la tensión interfacial y así evitar la formación de una nueva fase, se agrega un surfactante o agente tensoactivo (de la abreviación en inglés *Surface Active Agent*), que es generalmente un compuesto afín tanto a la fase oleosa como a la fase acuosa, lo que permite “encapsular” a la fase discontinua en la fase continua, y que en apariencia se aprecia como una solución homogénea.

## 2.13. Técnicas de caracterización

### 2.13.1. Espectroscopia de infrarrojo

La técnica de espectroscopia infrarroja ha sido utilizada desde hace varias décadas para la identificación, caracterización y cuantificación de muestras. Clásicamente, se hace pasar un haz de infrarrojo que posee la energía necesaria para hacer vibrar los enlaces covalentes de una molécula. Esta metodología utilizada sobre todo para las muestras orgánicas, trabaja con la parte del espectro electromagnético del infrarrojo medio y corresponde a números de onda entre  $4000-500\text{ cm}^{-1}$ . En un espectroscopio de transformada de Fourier lo que se tiene es un haz de luz IR que choca con un separador y divide el haz hacia la muestra y hacia un espejo fijo, recorriendo así, dos distancias distintas; al final, los haces se recombinan en el detector creando un modelo de interferencia denominado interferograma, con todas las frecuencias pero

desfasadas unas de otras por fracciones de segundo. Este interferograma está en el dominio del tiempo, que pasa al dominio de la frecuencia al aplicar la transformada de Fourier, obteniéndose así el espectro de IR de la muestra analizada. Esta técnica es bastante útil, sin embargo, obtener buenos resultados depende mucho de la preparación de la muestra y el espesor de la misma, lo cual no siempre es fácil para los polímeros, es por eso que para este tipo de muestras se utiliza la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR, por sus siglas en inglés), en donde un haz del IR atraviesa un cristal con un índice de refracción mayor al de la muestra. La reflectancia interna crea una onda denominada onda evanescente, la cual incide sobre la muestra que debe estar en contacto con el cristal, ya que la penetración de la misma es de 0.5-5 micrómetros. Cuando la energía de la onda evanescente es tal que la muestra absorbe, la onda se verá atenuada (alterada). La información regresa al haz IR que sale por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector que finalmente genera el espectro. La penetración del haz es función de la longitud de onda y ángulo de incidencia del haz, así como el índice de refracción del cristal utilizado. La Figura 19 esquematiza el funcionamiento descrito para una celda ATR.



**FIGURA 19. Representación de un elemento ATR con reflexión múltiple. Adaptado de nota técnica de PerkinElmer. (PERKIN ELMER, 2015)**

### 1.1.1. Espectroscopia UV-VIS

Esta técnica espectroscópica trabaja con fotones que tienen longitudes de onda entre 190-900 nm y que al incidir en las moléculas, promueven cambios no permanentes en los estados electrónicos de las mismas ( $n \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $\pi \rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \rightarrow \pi^*$ ,  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ), absorbiéndose parte de la energía perdida en el proceso. La espectroscopia UV-VIS es utilizada generalmente en la cuantificación de analitos de naturaleza conocida, ya que las bandas observadas en los espectros no son lo suficientemente específicas para permitir la identificación de un compuesto desconocido, como en el caso de la espectroscopia IR.

Para la cuantificación de un analito (en disolución), se aprovecha la relación existente entre la intensidad del haz emitido, la absorción del mismo por la muestra y su concentración en una disolución, es decir, la ley de Lambert & Beer, que se expresa como sigue:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = aCL \dots (1)$$

Donde:

A: Absorbancia de la muestra

$\frac{I_0}{I}$ : Relación entre la intensidad original y la final, es decir, el recíproco de la transmitancia

a: coeficiente de absorción

C: concentración de la muestra

L: longitud que recorre el haz al atravesar la muestra

Lo anterior tiene validez siempre y cuando el haz sea monocromático, la disolución del analito sea homogénea y que el estado físico o químico no cambie con la concentración del mismo.

### 1.1.2. Dispersión de Luz Dinámica

La Dispersión de Luz Dinámica (DLS por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para medir el tamaño de partícula y moléculas que se encuentran en suspensión. DLS mide la velocidad de las partículas que sufren movimiento browniano, el cual depende de la temperatura, la viscosidad y el tamaño de partícula. El movimiento browniano de las partículas se define por el coeficiente translacional de difusión que se relaciona con su diámetro hidrodinámico a través de la ecuación de Einstein-Stokes de la siguiente forma:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \dots (2)$$

$d_H$ : diámetro hidrodinámico

k: constante de Boltzmann

T: temperatura

$\eta$ : viscosidad

D: coeficiente de difusión

Cuando el haz es dispersado, se produce una interacción entre el haz de luz y el campo eléctrico que una pequeña partícula o molécula posee; el fotón induce un dipolo oscilante en la

nube electrónica y, como consecuencia, se emite energía en todas las direcciones, este fenómeno es conocido como dispersión de luz. Mediante algoritmos computacionales, los equipos de DLS construyen funciones que relacionan la intensidad de la luz dispersada y el coeficiente de difusión, obteniendo así, las distribuciones de tamaño de partícula.

Se pueden obtener tres tipos de distribución de tamaño de partícula: intensidad, volumen y número. El primero es el resultado directo de medir cuánta luz fue dispersada por las partículas; el segundo, refleja el volumen ocupado por las partículas medidas y es equivalente a una distribución en masa; y por último, la distribución en número refleja el número de partículas que existen para cada tamaño registrado.

### 1.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

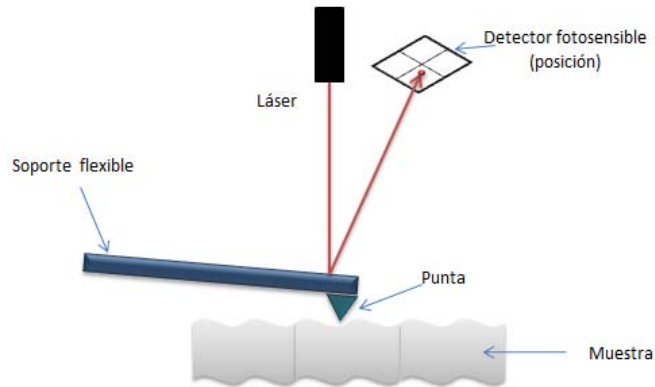
El Análisis Termogravimétrico (TGA) es una técnica de caracterización que monitorea los cambios en la masa ocurridos en una muestra al ser sometida a un calentamiento.

Un equipo de TGA posee una balanza de gran precisión que sostiene una charola donde se deposita la muestra a analizar. Esta charola es introducida en un horno que calienta la muestra, según lo requerido. El experimento puede llevarse a cabo en diferentes tipos de atmósferas, siendo la más común la de nitrógeno o argón (gas inerte) y oxígeno. Los cambios en masa son constantemente monitoreados y registrados.

Es una herramienta útil, ya que permite identificar la estabilidad térmica de la muestra, e incluso, su temperatura de descomposición.

### 1.1.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Esta técnica permite estudiar la topología de la superficie de las muestras que se someten a este estudio. A diferencia de otro tipo de micrografías, las imágenes de AFM se obtienen al explorar la muestra con una punta afilada (<50 nm de diámetro) colocada en el extremo de un soporte flexible, la variación del ángulo de inclinación es detectada por un haz láser que se encuentra posicionado sobre el soporte de la punta e indica los cambios en la superficie de la muestra, lo que se ilustra en la Figura 20. (Geisse, 2009)



**FIGURA 20. Componentes esenciales de un AFM.**

### 1.1.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Otra técnica comúnmente muy utilizada en la caracterización de materiales es la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), debido a que se consiguen imágenes con gran cantidad de información de superficie y morfología de las muestras. A diferencia de los microscopios ópticos, el SEM estudia las interacciones entre los electrones generados y el espécimen de estudio, por lo que la resolución es mayor, al no depender de la longitud de onda de los fotones de luz.

Los electrones son generados por un filamento de tungsteno, el haz formado es disparado y se abre paso atravesando primero los lentes condensadores y posteriormente los lentes objetivo hasta la muestra. Cuando los electrones son generados, puede suceder que: los electrones pasen simplemente a través de la muestra debido al gran espacio interatómico; se generen electrones secundarios próximos a la superficie de la muestra debido a choques entre los electrones generados en la fuente (utilizado principalmente para estudiar la topografía de una superficie); o que los electrones choquen con el núcleo de los átomos del material bajo estudio dando lugar a los llamados electrones electrodispersados (además de la topografía de la superficie, brinda una idea de la densidad de la muestra debido a que la interacción será diferente dependiendo del peso molecular de la muestra). Este estudio requiere además de una buena preparación de la muestra, ya que si ésta no es conductora, debe recubrirse con una capa delgada de un material que sí lo sea, comúnmente oro, plata, oro-paladio. (nanoScience instruments, 2015)

## 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.1. Equipos y reactivos

Los siguientes reactivos se utilizaron durante el desarrollo del proyecto:

El quitosano de bajo peso molecular fue adquirido en Aldrich, al igual que el glutaraldehído (disolución al 50% v/v), n-hexanol, ciclohexano y el surfactante Triton X-100, estos fueron utilizados como se recibieron sin previa purificación; la NVCL con 98% de pureza también de Aldrich, fue destilada a presión reducida; el ácido acético, la acetona y el etanol fueron adquiridos de Reproquifin, México; el ácido bórico, ácido cítrico y el ortofosfatotrisódico fueron adquiridas de J.T. Baker. Para la síntesis de los nanogeles se utilizó agua tridestilada para evitar la presencia de impurezas e iones.

Las ampollitas y tubos de vidrio utilizados para contener las muestras durante la irradiación fueron tipo Pyrex.

#### 3.1.1. Determinación de grupos desacetilados

El grado de desacetilación del quitosano se calculó con base en el método titulación ácido-base, es decir, se pesaron 0.125 g de CS los cuales fueron disueltos en 25mL de ácido clorhídrico 0.1 M. El sistema se puso bajo agitación magnética hasta que el CS fue completamente disuelto. La disolución fue titulada con NaOH 0.1 M y se fue graficando el valor de pH de la disolución conforme el volumen de NaOH era añadido. Con la expresión

$$\%NH_2 = \frac{(C_{HCl}V_{HCl} - C_{NaOH}V_{NaOH}) * 0.016}{G} * 100 \dots (3)$$

Se calculó el porcentaje de grupos amino, donde  $C_{HCl}$  y  $V_{HCl}$  es la concentración (mol/l) y volumen (l) de ácido clorhídrico;  $C_{NaOH}$  y  $V_{NaOH}$  la concentración (mol/l), volumen (l) de hidróxido de sodio utilizado, respectivamente; y 0.016 es el peso molecular del grupo  $-NH_2$  en 1 mL de HCl 0.1 M. El valor se dividió entre 0.0994 que corresponde al 9.94% de grupos  $-NH_2$  teóricos presentes en el CS. El proceso se realizó por triplicado y el resultado fue 79%. (Czechowska-Biskup et al., 2012)



### 3.1.2. Tamaño de partícula mediante DLS

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo en un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) Zetasizer Nano NS90 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) a una temperatura de 20 °C equipado con una fuente de luz láser de He-Ne con longitud de onda de 633 nm y una celda de cuarzo, ubicado en el departamento de Física de la UAM-Iztapalapa.

### 3.1.3. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) usando una rampa de calentamiento de 10 °C/min, desde 25 °C hasta 700 °C.

### 3.1.4. Espectroscopia FTIR-ATR

Los análisis de infrarrojo se hicieron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin-Elmer CETUS Instrument, Norwalk, CT) equipado con un accesorio para la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR) con punta de diamante.

### 3.1.5. Fuente de irradiación

La irradiación de las muestras se realizó en la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias de Nucleares (ICN) con una fuente de  $^{60}\text{Co}$  (Gammabeam 651 PT, Nordion International).

### 3.1.6. Espectroscopia UV-Vis

La carga y cesión del fármaco se llevó a cabo monitoreando la absorbancia del fármaco a diferentes tiempos, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis modelo Specord 200 Plus (Analytikjena, Jena, Alemania) que se encuentra en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM. La longitud de onda de máxima absorción para el 5-FU se encontró a  $\lambda=266$  nm y se utilizaron unas celdas de cuarzo de la marca Perkin-Elmer.

### 3.1.7. Microscopía Láser Confocal

Estos estudios se realizaron en RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research, Japón, con un microscopio modelo OLS4000 (Olympus, Tokyo, Japón).

### 3.1.8. Microscopía de Fuerza Atómica

Estos análisis fueron realizados en RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research, Japón, con un microscopio marca Asylum Research modelo MFP-3D (Oxford Instruments, Santa

Bárbara, CA) con puntas tipo NHC (Non-Contact/TappingMode, High resonance frequency) (Nano World Technologies, Suiza) y se utilizó el modo AC.

### 3.2. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental se resume en tres etapas principales, mismas que se presentan a continuación:

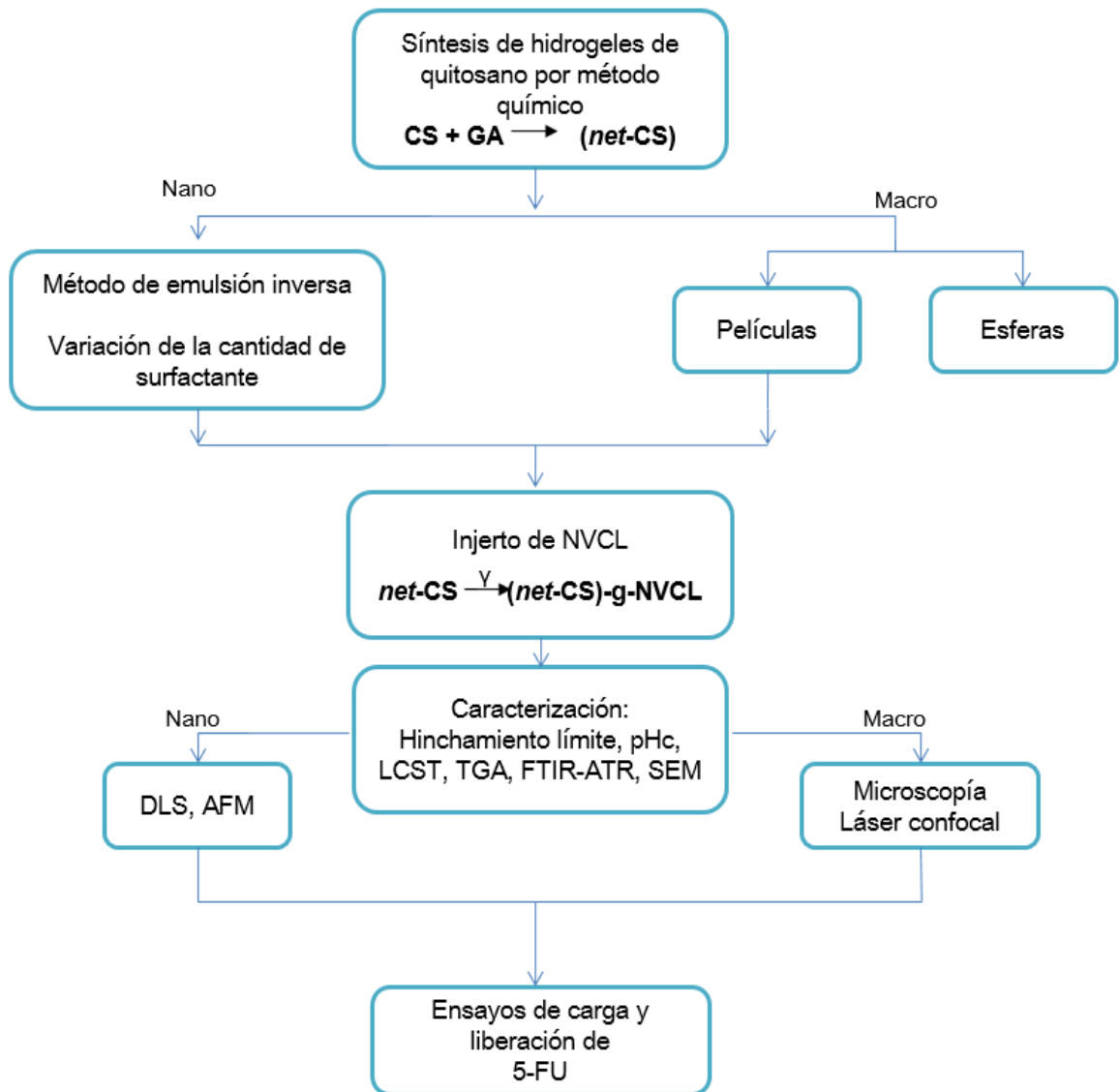


FIGURA 21. Etapas del procedimiento experimental.

### 3.3. Síntesis de macrogeles (*net-CS*)

#### 3.3.1. Procedimiento de elaboración de películas de CS entrecruzado por el método de evaporación (*net-CS*)<sub>F</sub>

- 1) Se preparó una disolución de quitosano (CS) (2 % w/v) en una disolución acuosa de AcOH (2 % v/v).
- 2) Se tomó una muestra de 15 mL y se vertió en una caja Petri de vidrio, mezclando rápidamente para homogeneizar.
- 3) Se agregó 0.15 mL de glutaraldehído (GA) al 50% v/v; es decir, el volumen de disolución de GA se adicionó al 1% v respecto a la disolución de quitosano.
- 4) Se tapó la caja Petri, dejando reaccionar por 24 horas y posteriormente se inició la evaporación de los disolventes.
- 5) Una vez secos, los geles se lavaron con una disolución de AcOH al 1% (v/v) durante 24 horas para eliminar el quitosano no reticulado y se realizaron lavados con agua destilada hasta pH neutro.
- 6) Los geles fueron secados hasta peso constante en una estufa de vacío a 60 °C y guardados en un desecador para su posterior utilización.

#### 3.3.2. Procedimiento de elaboración de esferas por el método de coacervación-precipitación (*net-CS*)<sub>b</sub>

Este procedimiento se adaptó del reportado en la literatura. (Chiou & Wu, 2004)

- 1) Se prepararon soluciones de quitosano al 3 y 5 % w/v en una disolución acuosa de ácido acético al 10 % v/v.
- 2) Con la ayuda de una jeringa (aguja comercial 27 G), fue goteada lentamente la disolución de quitosano, en una disolución 3:1 de NaOH(3M)/MeOH. Las esferas de CS fueron precipitando en la disolución. Después de 2 horas se agregó una disolución acuosa de glutaraldehído (50% v/v) al 3.3% v/v respecto al quitosano.
- 3) La reacción procedió por 24 h.
- 4) Transcurrido el tiempo, se decantó la mezcla NaOH/MeOH y se realizaron lavados con agua hasta obtener un pH neutro para eliminar los residuos de NaOH presentes.

- 5) Se llevó a cabo un lavado de ácido acético (5 %v/v) para eliminar el quitosano sin entrecruzar.
- 6) Posteriormente, se lavaron las esferas con agua destilada hasta obtener nuevamente pH neutro.
- 7) Se eliminó el exceso de agua.
- 8) Por último, las esferas fueron secadas en una estufa de vacío a 60 °C por 24 horas.

### 3.4. Síntesis de los nanogeles (*net-CS*)<sub>n</sub>

La síntesis de los nanogeles de quitosano (*net-CS*)<sub>n</sub> fue realizada utilizando el método de emulsión inversa. Se adecuó la metodología reportada por Artech Pujana y colaboradores (Artech Pujana et al., 2014) ya que se cuantificó la cantidad de surfactante utilizado, dato que no se encontraba reportado. En todos los casos se utilizó agua tridestilada para evitar la presencia de iones.

#### 3.4.1. Método I

Se preparó una disolución de quitosano (2% w/v) en una disolución acuosa de AcOH (2% v/v), la cual se dejó bajo agitación magnética durante una noche.

- 1) En un matraz de bola se mezclaron los siguientes reactivos bajo agitación magnética constante (700 rpm) en el siguiente orden: 4 mL de una disolución de CS, 4 mL de n-hexanol y 11 mL de ciclohexano a la mezcla, de manera que se consiguió una proporción 1:1:2.75 partes en volumen de los reactivos, respectivamente.
- 2) Se añadieron gota a gota 2.3 mL de surfactante (Tritón X-100) al matraz. Conforme el tamaño de partícula fue disminuyendo, la emulsión pasó de un aspecto lechoso y turbio a uno transparente, lo que sucede cuando el tamaño nanométrico de los geles de quitosano ha sido alcanzado.
- 3) Se realizó una disolución de glutaraldehído al 1% v/v en agua.
- 4) Por separado, se preparó una emulsión de glutaraldehído en un matraz de bola bajo agitación magnética (700 rpm) como se describe a continuación: se adicionaron al matraz 4 mL de disolución de GA, 4 mL de n-hexanol y 11 mL de ciclohexano (respetando así las proporciones 1:1:2.75 partes en volumen) y 4 mL de Tritón X-100. Se observó el mismo cambio de aspecto en la emulsión, de turbio a transparente.

- 5) Para el paso de entrecruzamiento, se adicionó la emulsión de glutaraldehído lentamente (gota a gota) a la de quitosano y se dejó reaccionar durante 24 horas.
- 6) Purificación.
  - a. Terminado el tiempo de reacción, las nanopartículas entrecruzadas fueron precipitadas de la siguiente forma: en un vaso de precipitados con una mezcla de etanol/acetona (1:1) bajo agitación magnética se añadió lentamente la mezcla de reacción, observándose al instante la precipitación de los nanogeles de color ámbar.
  - b. Posteriormente se centrifugó a 1700 rpm durante 7 minutos y se decantó el líquido sobrenadante; luego se repitió el paso de centrifugación por 5 minutos esta vez a una velocidad de 3000 rpm.
- 7) Los nanogeles se pasaron a un crisol de vidrio con placa porosa para eliminar el exceso de líquido. Una vez filtrados, se realizaron lavados de 1) etanol, 2) disolución de AcOH al 1% v/v, 3) agua hasta llegar a pH neutro, filtrando entre cada paso.
- 8) Se secaron en una estufa de vacío a 60 °C durante 24 horas hasta peso constante y posteriormente se colocaron en un desecador.

### 3.4.2. Método II

De forma similar a lo descrito en el Método I, mediante el método de emulsión inversa se realizó lo siguiente:

- 1) Se realizó una disolución de CS (2% w/v) en una disolución acuosa de AcOH (2% v/v).
- 2) En un matraz de bola bajo agitación magnética (700 rpm) se añadieron: 4 mL de disolución de CS, 4.9 mL de n-hexanol y 14.1 mL de ciclohexano. Estas cantidades corresponden a una proporción 1:1:2.75 de los reactivos en peso.
- 3) A la mezcla le fue adicionada 2.8 mL de surfactante (Tritón X-100).
- 4) Se preparó una disolución acuosa de glutaraldehído al 0.5% v/v.
- 5) De la misma manera, se preparó una emulsión de GA en un matraz de bola bajo agitación magnética (700 rpm) con 4 mL de disolución de GA, 4.9 mL de n-hexanol, y 14.1 mL de ciclohexano, respetando igualmente las proporciones en peso. Se añadieron 2.8 mL de Tritón X-100.

- 6) Se vertió lentamente la emulsión de GA a la de CS y se dejó reaccionar por 24 horas.
- 7) Purificación. En un vaso de precipitados bajo agitación magnética, los nanogeles fueron precipitados en acetona.
- 8) Los pasos 7 y 8 del Método I se llevaron a cabo de la misma manera.

### 3.4.3. Método III

En esta método se manejó relación másica de los componentes de la emulsión (1:1:2.75), como en el Método II, no obstante, la cantidad de surfactante fue distinta. A continuación se describe el procedimiento.

- 1) Se preparó una disolución de CS (2% v/v) en una disolución acuosa de AcOH (2% v/v).
- 2) En un matraz de bola y bajo agitación magnética (700 rpm) se preparó una emulsión de CS adicionando 4 mL de disolución del polímero, 4.9 mL de n-hexanol y 14.1 mL de ciclohexano, a la cual se le adicionaron 12 mL (11.2 g) de Tritón X-100.
- 3) Se preparó una disolución acuosa de GA al 0.5% v/v.
- 4) En un matraz de bola bajo agitación magnética (700 rpm) se realizó la emulsión de GA con 4 mL de disolución del entrecruzante, 4.9 mL de n-hexanol y 14.1 mL de ciclohexano, añadiendo 12 mL de surfactante.
- 5) El paso de entrecruzamiento se realizó al adicionar lentamente la emulsión de GA a la de CS y se dejó reaccionar durante 24 horas.
- 6) Purificación.
  - a. Los nanogeles fueron precipitados al añadir una mezcla acetona/etanol (1:1) a la reacción.
  - b. El sistema obtenido fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se realizaron dos lavados con agua/MeOH (1:1) y se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos.
  - c. Se decantaron, lavaron con agua y se centrifugaron durante 30 min a 10000 rpm.
- 7) El secado se llevó a cabo a presión reducida a 0.041 mBar y -53 °C durante 24 horas.

La siguiente tabla resume la información de las cantidades de los tres métodos descritos anteriormente.

Tabla 2. Cantidades de disoluciones y disolventes utilizados para formar las emulsiones.

	Componentes	Método I Volumen (mL)	Método II Volumen (mL)	Método III Volumen (mL)
Emulsión de CS	Disolución de CS	4	4	4
	n-hexanol	4	4.9	4.9
	Ciclohexano	11	14.1	14.1
	Tritón X-100	2.3	2.8	12
Emulsión de GA	Disolución de GA	4	4	4
	n-hexanol	4	4.9	4.9
	Ciclohexano	11	14.1	14.1
	Tritón X-100	4	2.8	12

### 3.5. Síntesis de copolímeros de injerto (*net*-CS)-g-NVCL

#### 3.5.1. Efecto de la dosis en el porcentaje de injerto

Tanto para los geles a escala macro como para los nano, el injerto de NVCL sobre los geles se llevó a cabo irradiando con dosis de 1 a 20 kGy a una razón de dosis de 5.7 kGy/h. Las disoluciones de monómero en las que se hincharon los nanogeles fueron 20, 30 y 50 % v/v de NVCL en AcOH en disolución acuosa (10% v/v).

- 1) Se distingue el procedimiento para nano y macrogeles
  - a. Nanogeles: se tomó una muestra previamente seca de (*net*-CS)<sub>n</sub> de 0.05 g y se colocó en un tubo de vidrio marca Pyrex, se añadieron 3.5 mL de la disolución de AcOH/N-vinilcaprolactama. El tubo se cerró con un tapón de hule.
  - b. Macrogeles: se pesó una muestra de (*net*-CS)<sub>F</sub> de 0.1 g y se colocó en un tubo de vidrio resellable marca Pyrex al que se le adicionaron 5 mL de la disolución de AcOH/N-vinilcaprolactama.
- 2) Para eliminar el oxígeno presente, se colocaron las ampollas en una línea de argón y se burbujeo el gas durante 20 minutos.
- 3) Para el caso de los nanogeles se hizo pasar la aguja por un tapón de hule y se colocó una aguja de purga. Cuando el tiempo de desgasificación hubo transcurrido, se retiraron rápidamente las agujas y se selló el pequeño orificio del tapón de hule del

tubo con papel Parafilm, para evitar la entrada de oxígeno o salida del gas argón. En el caso de los macrogeles, estos se sellaron con la ayuda de un soplete.

- 4) Los geles se dejaron hinchando 24 horas y se irradiaron a la dosis deseada.

### 3.5.2. Purificación del copolímero de injerto

Después de haber sido irradiadas, los tubos de vidrio fueron abiertos; se decantó el monómero y homopolímero presentes en la fase líquida. Se hicieron lavados para purificar la muestra con agua destilada, seguido de uno de AcOH al (1% v/v) y por último, se lavaron las muestras con agua destilada hasta que el pH de la muestra tuviera un valor neutro. Los materiales fueron filtrados, secados en una estufa de vacío a 60 °C durante 24 horas y por último fueron almacenadas en un desecador.

### 3.5.3. Cuantificación del porcentaje de injerto

La determinación del porcentaje de injerto se realizó por el método gravimétrico, determinando el peso de la muestra después de ser irradiada. Se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{Injerto} = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100 \quad \dots (4)$$

Donde:

$W_f$ : Peso final de la muestra después de ser injertada.

$W_0$ : Peso de la muestra antes de ser irradiada.

## 3.6. Caracterización de los sistemas

### 3.6.1. Tamaño de partícula

Para el Método I y II la determinación del tamaño de partícula se realizó en un equipo de Dispersión de Luz Dinámica tomando una muestra de 2 mL de la emulsión de polímero, el entrecruzante y el sistema entrecruzado justo después del periodo de reacción (24 horas) para obtener el tamaño promedio de las partículas en el momento en que son precipitadas.

Para el Método III las medidas de DLS fueron tomadas después de haber re-dispersado los nanogeles en AcOH (10 % v/v) en agua con una concentración de 10 mg/mL.



Adicionalmente, se determinó el tamaño de partícula en seco para los sistemas obtenidos por el Método III por AFM. Las muestras fueron fijadas a una platina de vidrio utilizando pasta de plata. El área de análisis fue 1 x 1  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.2. Cinética de hinchamiento

Las pruebas de hinchamiento ayudaron a la determinación de tres parámetros importantes en la caracterización de los geles sintetizados: hinchamiento límite, pH crítico y temperatura crítica (LCST). Estas pruebas consistieron en ir midiendo la absorción de agua, para ello, una muestra de masa conocida se sumergió, por tanto, la variable más importante por considerar es la masa de la muestra después de un tiempo determinado. Primero, fue necesario determinar el hinchamiento límite del hidrogel, lo cual se llevó a cabo en agua destilada y posteriormente este valor fue utilizado para determinar la temperatura y el pH crítico.

#### 3.6.2.1. Hinchamiento límite

Una muestra seca de masa conocida se colocó en un crisol de vidrio sinterizado. Se registró el peso inicial de la muestra seca y luego el hidrogel se sumergió en agua destilada, de forma tal, que el volumen de agua cubrió completamente el gel. Se tomaron mediciones de la masa después haber eliminado el exceso de agua. Las primeras mediciones se hicieron en intervalos cortos de tiempo dentro de los primeros 60 minutos y se monitoreó hasta asegurar que la masa final fuera constante, lo cual quiere decir que se ha llegado al valor de hinchamiento límite. Este valor sirvió como referencia para determinar el valor de pH y temperatura crítica.

El porcentaje de hinchamiento se determina por diferencia gravimétrica como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\% \text{Hinchamiento} = \frac{W_h - W_0}{W_0} \times 100 \dots (5)$$

Donde

$W_h$ : peso de la muestra hinchada a diferentes tiempos.

$W_0$ : peso de la muestra seca.

#### 3.6.2.2. pH crítico

Se prepararon soluciones buffer con diferentes valores de pH (2-11) mezclando una disolución ácida de ácido bórico al 0.2 M y ácido cítrico 0.05 M con una disolución básica de

Ortofosfatotrisódico dodecahidratado 0.1 M hasta ajustar a los valores deseados con ayuda de un pH-metro.

Para la determinación de pH crítico se pone a hinchar el gel (de manera análoga a la determinación del hinchamiento límite) en una disolución buffer con pH conocido durante el tiempo de hinchamiento límite (en agua), se pesa el gel y se determina el porcentaje de hinchamiento con ayuda de la expresión (5). Se grafica el porcentaje de hinchamiento contra el valor de pH. El punto de inflexión de la curva obtenida marca el valor del pH crítico.

### 3.6.2.3. Temperatura crítica

La temperatura crítica se determinó sumergiendo las muestras en agua destilada en un sistema cerrado. Éstas fueron colocadas en un baño maría 20 °C durante un tiempo mayor al de hinchamiento límite para asegurar que las condiciones de equilibrio se hubieron alcanzado. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de humedad de la muestra, se pesa y se registra el valor. El proceso se repite a diferentes valores de temperatura (28-38 °C).

### 3.6.3. Análisis termogravimétrico

Una muestra previamente seca de los hidrogeles injertados fue colocada en una charola de platino. El análisis se llevó a cabo en el intervalo de temperaturas de 25 a 600 °C en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

## 3.7. Estudios de carga y cesión de 5-FU

Para cuantificar la cantidad de fármaco incorporado y liberado se realizó la curva de calibración del 5-FU en agua.

Se elaboró una disolución stock de 5-FU de concentración conocida (0.016 mg/mL) y se realizaron diluciones tomando alícuotas con pipetas aforadas. El máximo de absorción para el 5-FU se midió a  $\lambda = 266$  nm. Para realizar la validación del método, se repitió la curva tres veces y se calcularon los porcentajes de recuperación (PR) de la muestra y el coeficiente de variación (CV) de la misma. Estos cálculos se describen en el Anexo I donde se muestra la curva y los análisis de ajuste de la recta de calibración.

### 3.7.1. Carga de 5-FU

El procedimiento general de carga tanto para sistemas macro como nano se realizó por triplicado y es el que se describe a continuación:

- 1) Una muestra de 10 mg de (*net*-CS)-g-NVCL injertado previamente seco, se sumergió en 10 mL de una disolución acuosa de 5-FU con una concentración de 0.016 mg/mL, la cual se puso bajo agitación magnética a 110 rpm.
- 2) Para monitorear la cantidad de fármaco cargado, después de cada determinado tiempo se tomaron alícuotas de la disolución (3mL) donde se sumergió el polímero. La muestra fue filtrada con ayuda de membranas Millipore y se vertió en una celda para su análisis mediante espectrofotometría UV-VIS, observando la disminución en el pico de absorbancia a los 266 nm, lo que indicaba el decremento de la concentración de la solución. Cuando la absorbancia dejó de disminuir, los geles fueron filtrados y secados mediante liofilización.

### 3.7.2. Liberación de 5-FU

Para los geles nano- y macro- se realizó lo siguiente:

- 1) La muestra previamente cargada con el fármaco fue pesada y se le añadieron 10 mL de agua (grado Milli-Q).
- 2) Fueron puestos bajo agitación magnética a 125 rpm en un baño térmico a 37 °C.
- 3) Se tomaron alícuotas de ~2 mL y se monitoreó la liberación del fármaco en el medio mediante el incremento de la absorbancia medida a 266 nm hasta que esta fue constante.

## 4. Análisis de Resultados

### 4.1. Síntesis de hidrogeles de CS

#### 4.1.1. Mecanismo de formación de la red de CS (*net*-CS)

Tanto para sistemas macro como nano, la reacción que da lugar a la formación de la red de CS (que se denominará *net*-CS de ahora en adelante) se llevó a cabo de la misma forma, la cual se describe a continuación.

Como primer paso del procedimiento experimental, el entrecruzamiento se realiza al hacer reaccionar al quitosano con el glutaraldehído, con lo que se obtiene el hidrogel ya que se forman enlaces covalentes mediante la reacción de los grupos amino de la parte desacetilada de la molécula de quitosano (que por conveniencia, sólo se muestra esa parte en el esquema) con los grupos aldehído de la molécula de entrecruzante; debido a la estructura helicoidal del CS, los enlaces imino deben presentarse dentro y fuera de la estructura como se aprecia en la Figura 22. (Webster, Halling, & Grant, 2007)

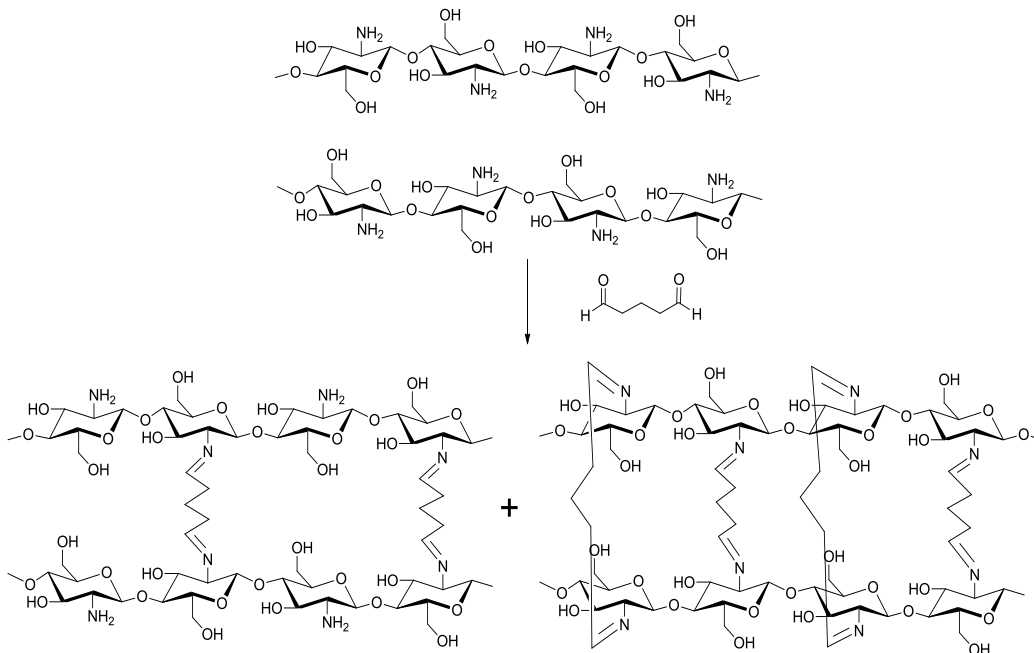


FIGURA 22. Formación la red de CS al ser entrecruzado con GA (*net*-CS).

En la Figura 23, se muestra el mecanismo detallado que da lugar a la formación del hidrogel de quitosano mediante la formación de una base de Schiff o imina (Singh et al., 2006). El mecanismo se explica a continuación: el primer paso identificado con la letra A. es el ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo del glutaraldehído; el segundo paso B. es la protonación del oxígeno del grupo carbonilo y la desprotonación de la amina para dar lugar a la carbonilamina; posteriormente C. el grupo hidroxilo formado se protona; después, el siguiente paso D. es cuando el par de electrones del grupo amino forma un enlace, dando lugar a la deshidratación de la molécula; a esto le sigue la formación de las estructuras resonantes donde se resalta el intermediario mayoritario (paso E.); finalmente, en el paso F. ocurre la desprotonación de la molécula para dar lugar a la imina o base de Schiff. Por conveniencia, el mecanismo se muestra para un grupo aldehído de la molécula de GA, siendo análogo el mecanismo de reacción para el segundo grupo CHO.

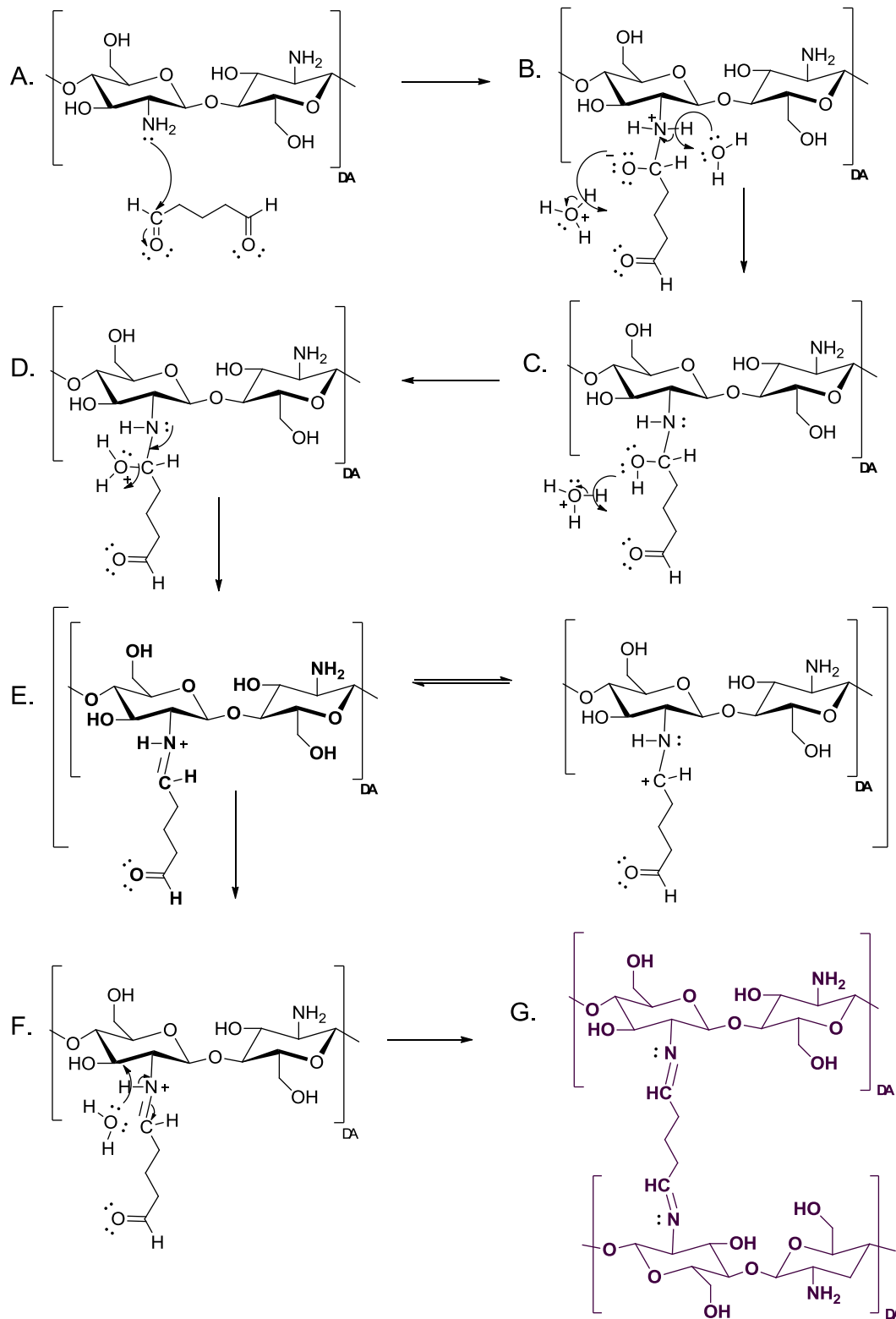


FIGURA 23. Mecanismo de formación de una base de Schiff por el cual se obtiene la red de quitosano con glutaraldehído (*net-CS*).

#### 4.1.2. Ventajas y desventajas de las redes obtenidas y elección de los hidrogeles para ser preparados

Como se describió en el procedimiento experimental, se trabajó con diferentes métodos de obtención de sistemas de tamaño macroscópico y se varió la metodología de síntesis de los sistemas nano, por lo cual, hubo la necesidad de elegir un procedimiento.

En lo referente a los sistemas macro, las esferas obtenidas fueron de síntesis relativamente sencilla; sin embargo, el problema fue controlar el flujo de la disolución de quitosano, lo cual se volvía más difícil conforme la concentración aumentaba debido a que la viscosidad del medio también lo hacía, por lo que el diámetro de las esferas podía variar dependiendo de la presión ejercida sobre la aguja y era difícil determinar la cantidad de quitosano precisa que reaccionaba. Aunado a esto, una vez que se deseó caracterizarlas, se observó que sufrían una deformación permanente al momento de ser hinchadas y, por tanto, el comportamiento reversible de los geles se vio afectado. Por este motivo, las esferas fueron descartadas para su posterior utilización, lo que dio lugar a la búsqueda de una nueva metodología de síntesis de geles macroscópicos; a pesar de esto, se muestran y se discuten las pruebas de caracterización realizadas a este sistema cuyos resultados se muestran en el ANEXO II. Por su parte, los hidrogeles de CS entrecruzado en forma de películas presentaron una manipulación más sencilla en su síntesis, donde el paso que determinaba que la superficie fuera lo más homogénea posible era tanto la estabilidad de la superficie donde residía la película como la velocidad de evaporación del disolvente, por lo que ésta se realizaba de manera lenta.

Para los sistemas nano, se eligió el método de emulsión inversa ya que es posible obtener tamaños de partícula con dimensiones entre 100-300 nm (Yao, Li, Yao, & Yin (Editores), 2012). Sin embargo, la literatura revisada no expresa explícitamente la cantidad de surfactante que debe ser utilizado, haciendo solamente la observación cualitativa de que la emulsión debe verse transparente para que los geles alcancen el tamaño nanométrico deseado (Zhi, Wang, & Luo, 2005) (Pujana Arteché, Pérez-Álvarez, Cesteros Iturbe, & Katime, 2013) (Arteje Pujana, Pérez-Álvarez, Cesteros Iturbe, & Katime, 2012); este dato es un factor determinante para la reproducibilidad del experimento, por cual, se realizaron varias pruebas para encontrar la cantidad de surfactante que brindara equilibrio termodinámico a la emulsión y permitiera obtener tamaños de partícula del orden nanométrico. En el presente trabajo se reportan únicamente tres variaciones del método de emulsión inversa para la obtención de los

nanogeles, ya que fueron con los que se obtuvieron los resultados más reproducibles. En todos los casos, la relación entre los componentes es 1:1:2.75, sin embargo, para el Método II y III la relación se maneja en masa, a diferencia del primero donde la relación está dada en volumen, lo que facilitaba el trabajo con los reactivos que encontraban en estado líquido. El mayor inconveniente del Método II era que la emulsión se rompía fácilmente, tornándose turbia y como consecuencia, el tamaño de partícula era más grande de lo esperado; por su parte, el Método III requería una gran cantidad de surfactante, lo que dificultaba su purificación requiriendo un mayor número de lavados y mayor gasto de reactivos; finalmente, el Método I fue el que resultó más adecuado después de varias modificaciones. En este método se cuantificó la cantidad de surfactante, más allá de la simple observación cualitativa, y se obtuvieron tamaños de partícula menores a 100 nm para todos los casos, razones por las que se eligió para realizar la reacción de injerto.

## 4.2. Síntesis del copolímero de injerto de NVCL sobre hidrogeles de CS [(*net*-CS)-g-NVCL]

### 4.2.1. Mecanismo de injerto

A continuación se propone el mecanismo de reacción entre la NVCL y el CS cuando son irradiados para dar lugar al injerto en los hidrogeles nano y macro.

El mecanismo por el que procede la reacción de injerto es por radicales libres. Es claro que en la NVCL, los sitios reactivos se producen en el enlace vinílico lo que dará lugar a la polimerización de la misma; la reacción de homopolimerización de la NVCL se ilustra en la Figura 24.

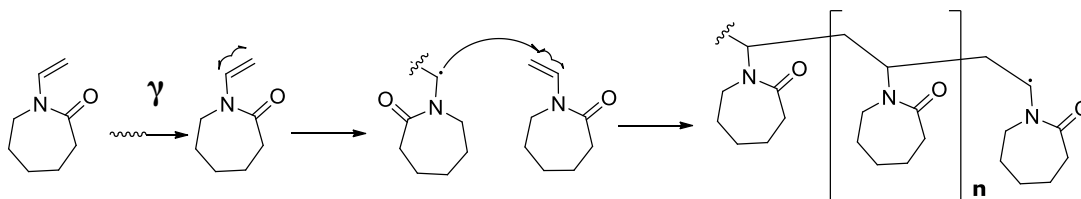


FIGURA 24. . Reacción de polimerización de la NVCL iniciada por radiación gamma.

Por su parte, cuando el CS es irradiado, se espera que produzca sitios reactivos análogos a los que se han encontrado en otros carbohidratos ya estudiados, donde todos los sitios C-H del anillo de piranosa así como el sustituyente  $-CH_2OH$  están involucrados en el proceso de



formación de radicales, con poca selectividad a los radicales reactivos como son los OH (Gryczka et al., 2009). Estas especies primarias dan lugar a cetonas, aldehídos y grupos carboxílicos en la estructura irradiada del CS, que son consecuencia de la inestabilidad térmica de los radicales centrados en los carbonos C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> en el anillo. Estas especies también se ven sometidas a escisión β por debajo de la temperatura ambiente, lo que da lugar al rompimiento del anillo (provocado por el radical situado en C<sub>5</sub>) y la escisión de cadena (debido a los radicales centrados en C<sub>1</sub> y C<sub>4</sub>), lo que provoca radicales reactivos secundarios y grupos carbonilo.

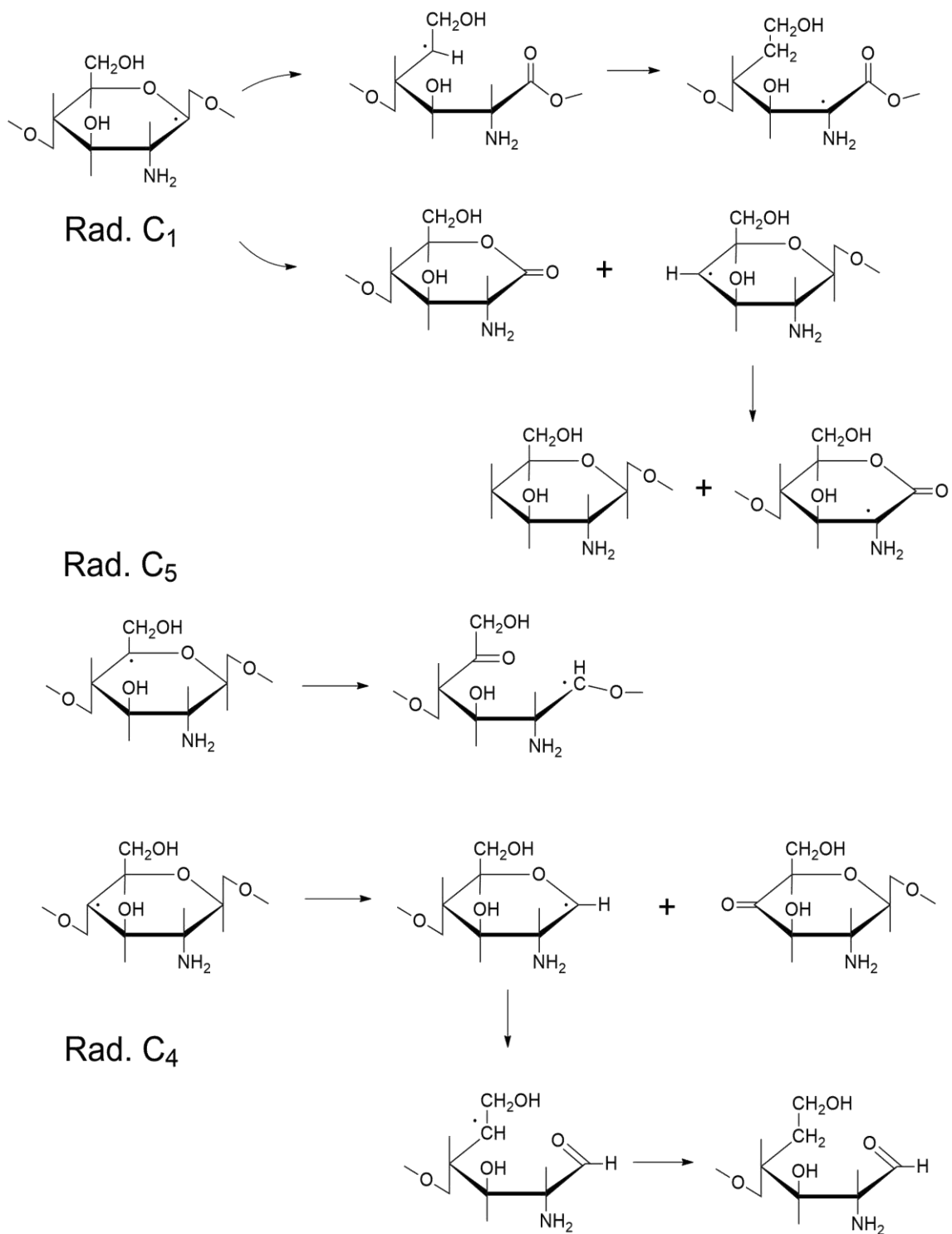
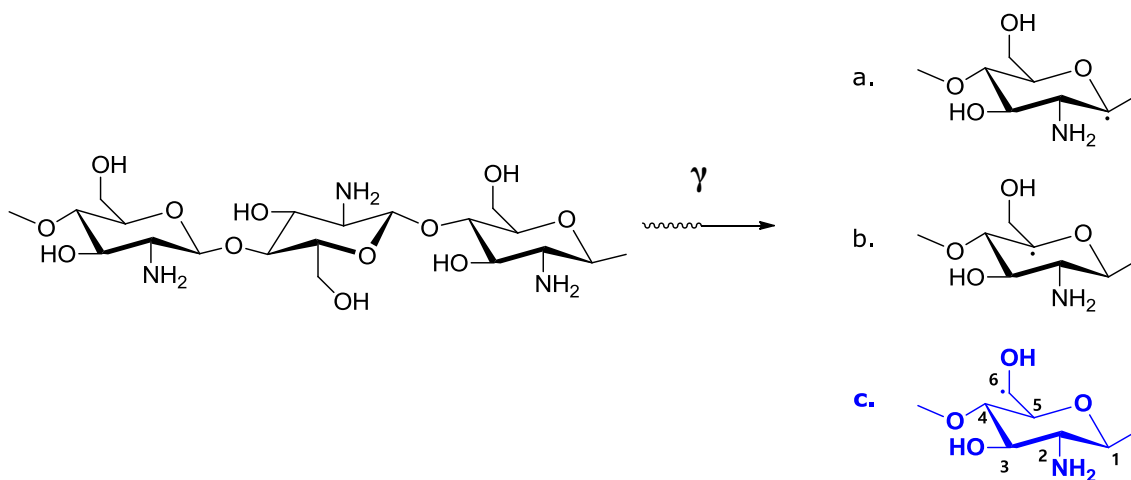


FIGURA 25. Mecanismo de radiólisis del CS en estado sólido. Adaptado de (Gryczka et al., 2009).

La Figura 25 ilustra los productos de degradación del CS cuando es irradiado; sin embargo, aunque en menor proporción, y antes de que se dé lugar a los productos de descomposición, también se producirán radicales donde el monómero de NVCL podría ser injertado, estos posibles radicales pueden observarse en la Figura 26.



**FIGURA 26. Radicales primarios formados cuando el quitosano es expuesto a radiación ionizante. Adaptado de (Gryczka et al., 2009).**

La figura anterior muestra tres radicales susceptibles a iniciar la reacción de injerto, con sitios activos en C<sub>1</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>. En el presente trabajo se propone que el injerto se lleve a cabo mediante el radical denominado como **c.**, debido a que las cadenas poliméricas de NVCL se verían impedidas estéricamente en los otros sitios del anillo de piranosa de la estructura del CS.

La Figura 27 muestra la estructura propuesta para el injerto de NVCL en el CS entrecruzado, señalando que el injerto es promovido desde el radical creado en el hidrogel hacia el monómero vinílico (*grafting from o grafting hacia*) e iniciando de esta manera la polimerización de la NVCL.

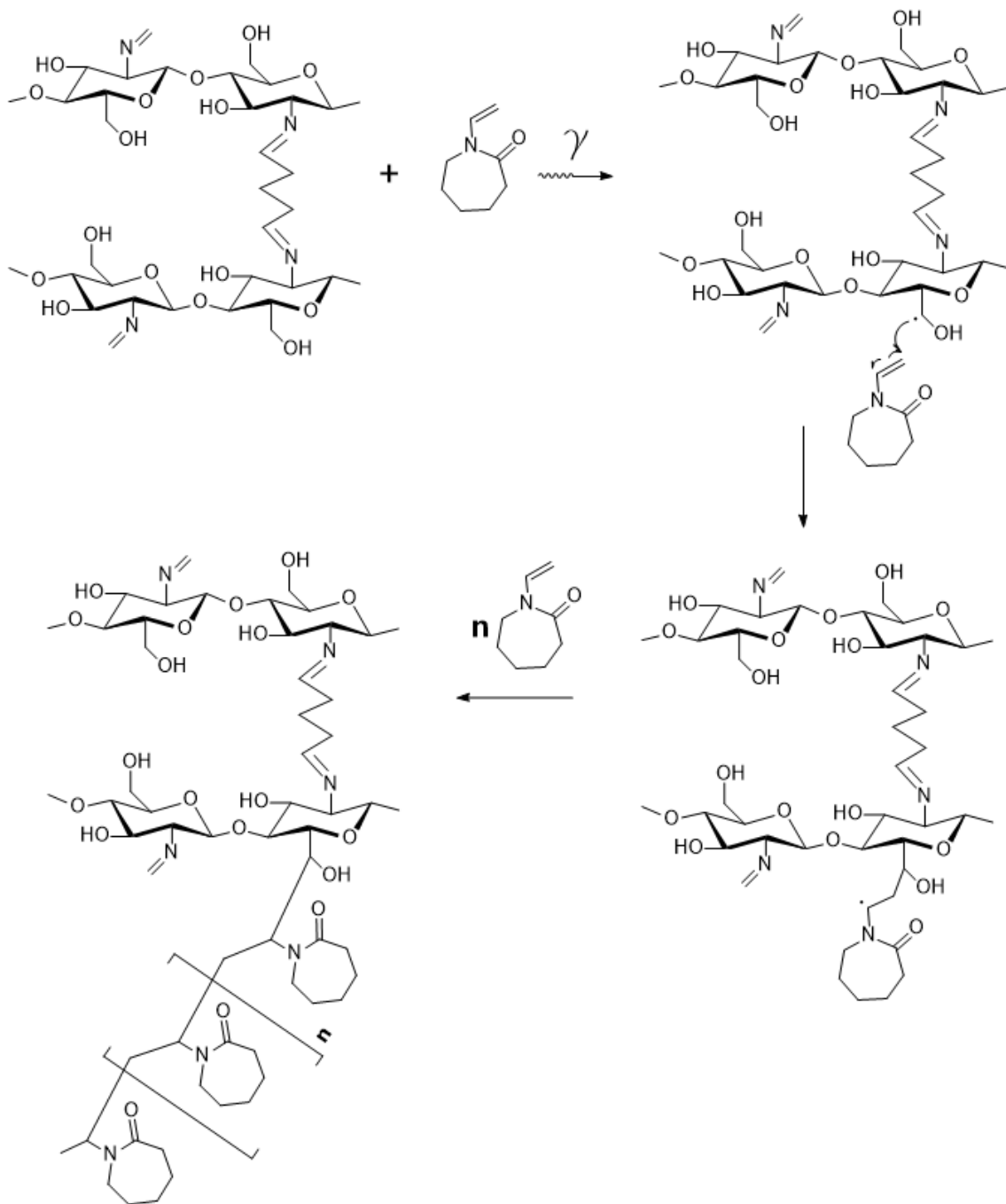


FIGURA 27. Reacción de injerto de la NVCL y la red de CS.

#### 4.2.2. Estudio del efecto de la dosis en el porcentaje de injerto

Para evaluar el efecto de la dosis en el porcentaje de injerto, se irradiaron muestras en un intervalo de dosis de 1-20 kGy, ya que se quiso favorecer el injerto sobre el efecto de degradación que sufre el CS a dosis altas de irradiación (Pasanphan et al., 2010). La reacción de copolimerización de NVCL en el CS entrecruzado se llevó a cabo a una concentración fija de CS, pero se varió la concentración del monómero (20, 30 y 50 % v/v en AcOH al 10 % v/v). Este efecto se evaluó tanto en las películas como en los nanogeles de CS reticulados, lo cual se observa en las Figuras 28 y 29. Las líneas marcadas en las gráficas de Dosis contra %Injerto para los sistemas macro y nano son una guía al ojo del espectador y representan la tendencia del comportamiento del injerto sobre los hidrogeles.

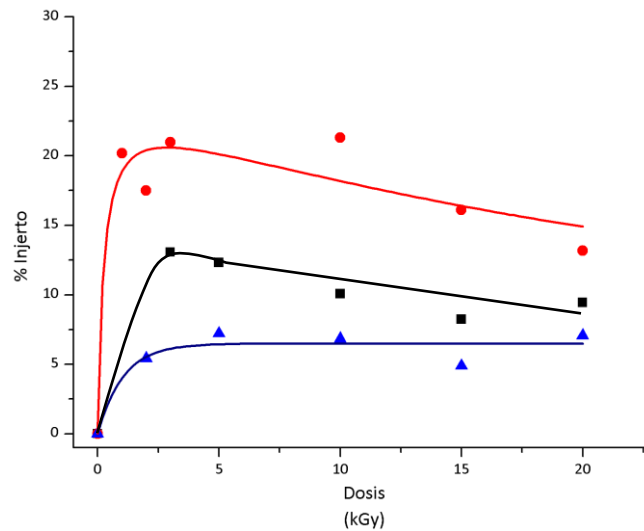


FIGURA 28. Injerto de NVCL en macrogeles de CS en función de la dosis a diferentes concentraciones de NVCL. Concentración de CS: 2 % w/v; concentración de NVCL: ■ 20 % v/v; ● 30 % v/v; ▲ 50 % v/v.

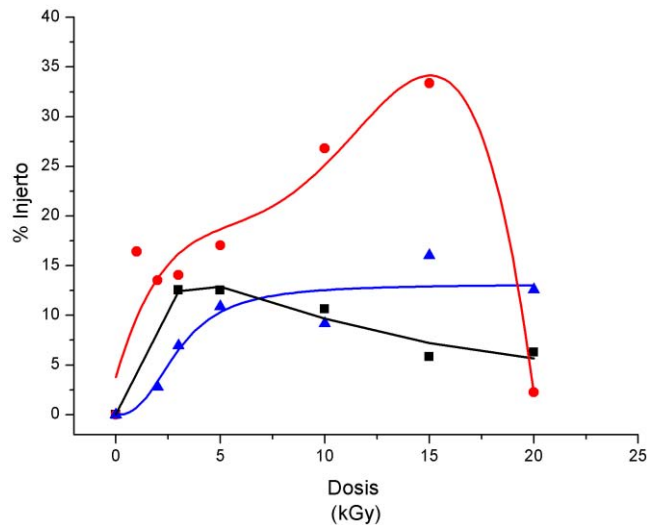


FIGURA 29. Injerto de NVCL en nanogel de CS en función de la dosis a diferentes concentraciones de NVCL.

Concentración de CS: 2 % w/v; concentración de NVCL: ■ 20 % v/v; ● 30 % v/v; ▲ 50 % v/v.

De las gráficas presentadas (Figura 28 y 29), el resultado más evidente es que la cantidad de NVCL injertada fue mayor en los sistemas nanométricos, lo cual se puede explicar debido al hecho de que las nanopartículas reticuladas de  $(net-CS)_n$  poseen mayor área superficial que las películas de  $(net-CS)_F$ ; esto aumenta la probabilidad de que el monómero reaccione con un radical generado en la matriz polimérica de CS. También puede señalarse que aunque a mayores dosis se generan mayor cantidad de sitios reactivos, los porcentajes de injerto máximo se alcanzaron con dosis bajas, debido al efecto de degradación del CS.

Otro resultado importante es que para ambas escalas, el mayor porcentaje de injerto se obtuvo cuando la mezcla de monómero/disolvente se encontraba presente en un 30 % v/v respectivamente, lo que puede deberse a que esta es la concentración donde el monómero se difunde fácilmente en el sistema polimérico; es decir, la disolución monomérica no es tan viscosa como para impedir que la NVCL entre en contacto con los radicales creados en el CS y no promueve grandes porcentajes de homopolimerización. Para los sistemas nanométricos, el máximo porcentaje de injerto se obtuvo a la dosis de 15 kGy, mientras que para los sistemas macro se los porcentajes de injerto se mantuvieron aproximadamente constantes entre las dosis de 1-10 kGy.

También se observa un comportamiento similar en cuanto a la cantidad de monómero injertado en la red para la concentración monómero/disolvente de 20 % v/v, obteniendo los porcentajes máximos a las dosis más bajas y disminuyendo al aumentar la dosis.

Cuando el injerto se llevó a cabo en el sistema macro y el monómero estuvo presente al 50 % v/v, es posible apreciar que el injerto en los geles de CS fue menor al obtenido con las otras dos concentraciones y se mantuvo prácticamente constante, lo que puede atribuir a que a mayor concentración del monómero, existe un aumento en la viscosidad en el medio de reacción, lo cual favoreció la formación de mayores cantidades de homopolímero.

Por las características del experimento, el análisis del efecto de la dosis en el porcentaje de injerto puede ser deducido a partir de los resultados presentados, donde la concentración con la que se obtienen los mayores porcentajes de injerto es 30 % v/v de NVCL/AcOH para macro- y nano- geles, y los menores con una concentración de 50 % v/v de monómero debido a que la viscosidad del medio se incrementa, dificultando la reacción de injerto en la matriz de *net*-CS.

#### 4.2.3. Espectroscopia FT-IR

Para verificar que la síntesis de los hidrogeles y la incorporación de la NVCL se llevó realmente a cabo en los mismos, se utilizó el análisis de espectroscopia IR para identificar los grupos presentes en la estructura.

En la Figura 30 se identifican los espectros infrarrojos como se enuncia a continuación: con la letra A. se distingue el CS puro, B. *net*-CS, C. PNVCL, D. nanopartículas de (*net*-CS)<sub>n</sub>-g-NVCL y E. películas de (*net*-CS)<sub>f</sub>-g-NVCL.

Para el CS se observan bandas en 3356 y 3291 cm<sup>-1</sup> que corresponde a los estiramientos del grupo N-H y O-H; en 2918 cm<sup>-1</sup> y 2869 cm<sup>-1</sup> se muestran las bandas del estiramiento del enlace C-H; en 1647 cm<sup>-1</sup> se muestra el estiramiento del enlace carbonilo C=O de la parte acetilada de la molécula y finalmente en 1592 cm<sup>-1</sup> puede observarse tanto la torsión de la amina primaria y el estiramiento asimétrico del enlace C-N (Hoffmann et al., 2009). Cuando el CS fue entrecruzado se puede observar una sola banda de absorción en 3289 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento del enlace O-H; también se observa un pequeño corrimiento a 1643 cm<sup>-1</sup> de la banda correspondiente al C=O de los grupos acetamida remanentes en el CS, así como la aparición de la banda en 1566 cm<sup>-1</sup>, que muestra la formación de los grupos iminio C=N, debido a la reacción de entrecruzamiento. (Singh et al., 2006; Li & Bai, 2005; Maza Mejía & Jacinto Hernandez, 2007) En el espectro de la PNVCL se distinguen las bandas en 3263 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento del enlace N-H; en 2923 cm<sup>-1</sup> y 2854 cm<sup>-1</sup> los estiramientos C-

H; en  $1629\text{ cm}^{-1}$  la banda característica del enlace carbonilo C=O y en  $1479\text{ cm}^{-1}$  la vibración de estiramiento del carbono próximo al nitrógeno en el anillo de la caprolactama C-N.

Los sistemas (*net*-CS)-g-NVCL muestran una banda de absorción en  $3286\text{ cm}^{-1}$  y  $3285\text{ cm}^{-1}$  (nano y macro, respectivamente), región perteneciente a los estiramientos de los enlaces O-H y de las aminas; se identifican también los estiramientos de los enlaces C-H desplazados a  $2930\text{ cm}^{-1}$  y  $2874\text{ cm}^{-1}$  para las nanopartículas, así como a  $2963\text{ cm}^{-1}$  y  $2874\text{ cm}^{-1}$  en las películas reticuladas injertadas macro; por último, también se observan las bandas del grupo C=O presentes tanto en la parte acetilada remanente del CS, como a la incorporación de la NVCL en los nanogeles a  $1641\text{ cm}^{-1}$  y  $1638\text{ cm}^{-1}$  en los sistemas macro.



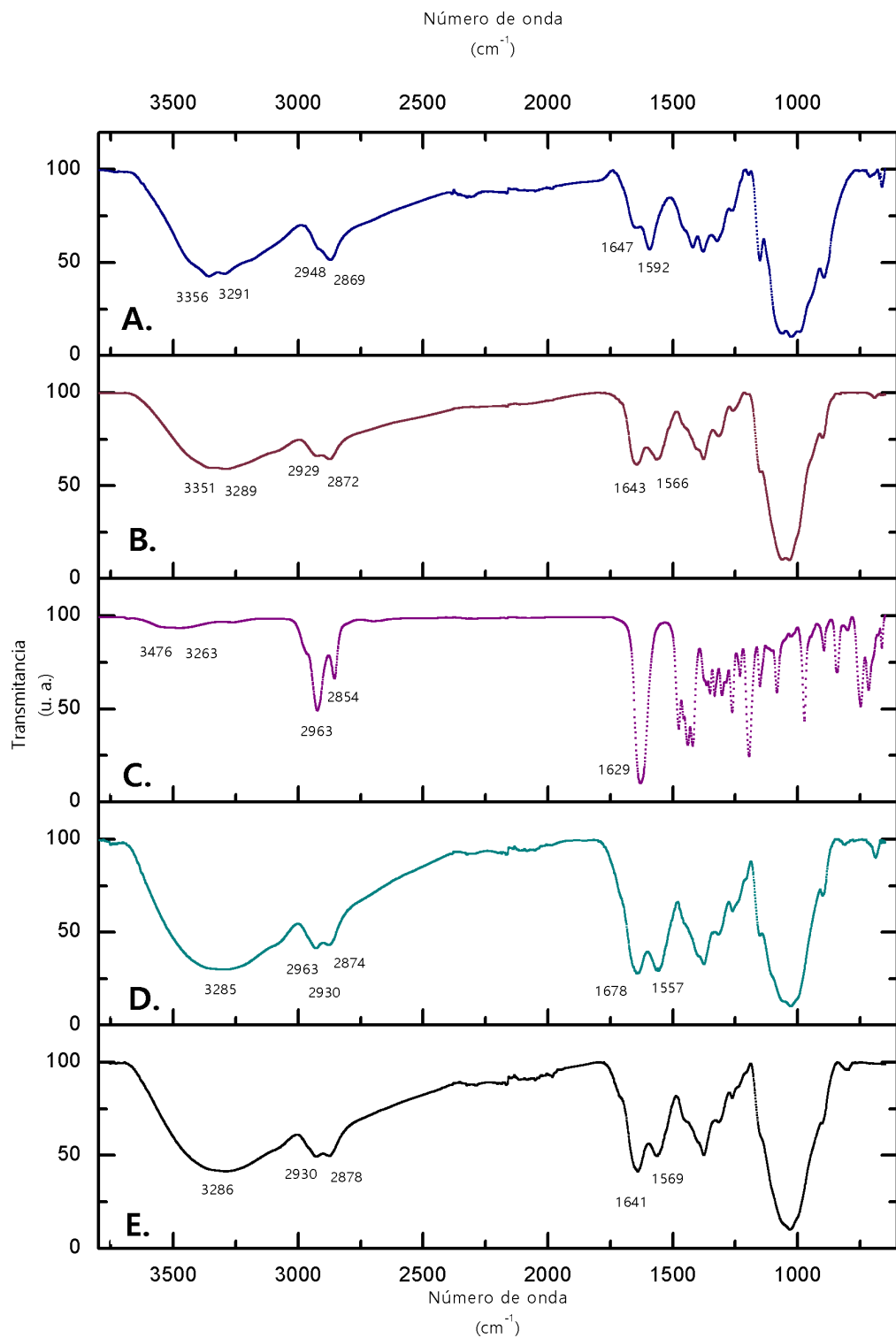


FIGURA 30. Espectro infrarrojo de: A. CS; B. *net*-CS; C. PNVCL; D. *(net-CS)-g*-NVCL escala nano; E. *(net-CS)-g*-NVCL escala macro.

## 4.3. Caracterización

### 4.3.1. Determinación del tamaño de las nanopartículas de $(net-CS)_n$ -g-NVCL mediante DLS

A continuación se presentan los resultados obtenidos por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) donde el valor reportado corresponde al tamaño de los nanogeles en su estado hinchado.

Para entender mejor los valores que se presentan, debe tomarse en cuenta que el equipo por sí mismo reporta tres distribuciones de tamaño de partícula: intensidad, número y volumen. La primera distribución muestra el resultado de la luz dispersada por las partículas, por lo que refleja el valor más cercano al tamaño real de la partícula (diámetro hidrodinámico de la partícula); si la muestra medida no fue bien preparada y presenta agregados o contaminantes tales como polvo, el resultado será una distribución con tamaños de partícula muy grande y no el valor real de las partículas suspendidas. Ahora bien, si se cuenta con varios tamaños de partícula, es natural preguntarse qué cantidad se ha obtenido de cada uno, lo que puede saberse por medio del análisis de las distribuciones en volumen (la más utilizada) o en número; es decir, son distribución en masa de las partículas analizadas y muestran de forma aproximada la cantidad presente de cada tamaño de partícula en la muestra. Por estas razones a continuación se mostrará el tamaño (nm) de las partículas provenientes de la distribución en intensidad y el porcentaje presente de cada uno derivado de la distribución en volumen.

#### 4.3.1.1. Resultados del Método I

Los resultados de tamaño de partícula determinado por la técnica de DLS se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del tamaño de partícula medidos por DLS para el Método I.

Sistema	Tamaño (nm)	Desviación Estándar (nm)	% Másico
Emulsión CS	8.4	1.1	97.6
	72.3	9.2	2.4
Emulsión GA	33.1	8.6	99.6
	907.0	134.5	0.4
<i>net-CS</i>	34.8	7.6	95.4

	<b>205.8</b>	<b>38.1</b>	<b>4.6</b>
<b><i>net-CS-g-NVCL</i></b> <b>(12 %g)</b>	<b>189</b>	<b>38.5</b>	<b>-</b>

Tomando en cuenta los tamaños de la distribución de intensidad y los porcentajes máxicos reportados, se asegura que las partículas sintetizadas se encontraron por debajo de los 200 nm (>95%).

En cuanto al tamaño de las nanopartículas reticuladas e injertadas, el valor es mayor debido a que una vez que hubieron sido purificados después del proceso de injerto, los nanogel se tuvieron que haber sido secados y posteriormente secados para medir el tamaño de partícula, por lo que pudieron formarse agregados de partículas o estas no fueron re-dispersadas apropiadamente; aun así, el tamaño es menor a 200 nm.

#### 4.3.2. Estudios de hinchamiento

##### 4.3.2.1. Determinación del hinchamiento límite

Para conocer los valores de pH y temperatura crítica, se realizó primero el estudio de hinchamiento límite en agua, lo que mostró que los hidrogeles de CS experimentaron cambios en su capacidad de hinchamiento conforme el porcentaje de NVCL injertado aumentaba. Este valor se utilizó como referencia para determinar el valor del pH y temperatura crítica.

En la Figura 31 se puede observar claramente que debido al injerto de NVCL en las películas del hidrogel de CS, el sistema tarda más en alcanzar su valor de hinchamiento límite, lo cual puede deberse a que las cadenas del polímero injertado en el hidrogel dificultan la difusión del agua en el sistema. Los tiempos de hinchamiento aumentan considerablemente de 20 minutos para el hidrogel de CS a 1 h 40 min para los sistemas con un injerto entre 9-12%, y 2 h 30 min para sistemas con 20 % de injerto; la cantidad de agua que los sistemas retienen también es menor conforme la cantidad de NVCL injertada fue mayor. Las líneas representan una guía al ojo del espectador respecto al comportamiento que siguieron los hidrogeles nano y macro respecto al tiempo de hinchamiento límite.

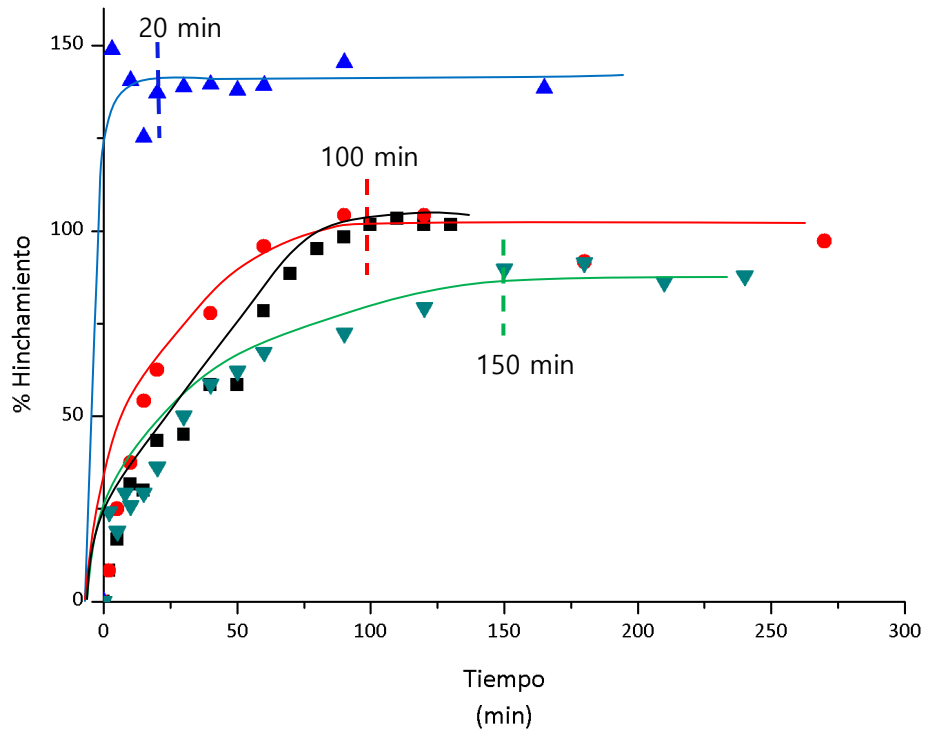


FIGURA 31. Determinación del hinchamiento límite en agua destilada de los sistemas macro con diferente porcentaje de injerto: ■  $(net-CS)_F-g-NVCL9$  %; ●  $(net-CS)_F-g-NVCL 12$  %; ▼  $(net-CS)_F-g-NVCL 20$  %; ▲  $(net-CS)_F-g-NVCL 17$  %.

En cuanto a los sistemas de nanopartículas, la Figura 32 muestra que, aunque en primera instancia el tiempo de hinchamiento límite también es mayor si el sistema está injertado, el comportamiento es distinto, observándose que el tiempo es más largo a menores porcentajes de injerto (30 min para un injerto de 10% y 10 min para un injerto de 17 %).

Las gráficas muestran que los sistemas macro retienen una menor cantidad de agua que los nano, y que estos últimos llegan al hinchamiento límite en un tiempo mucho más corto que los sistemas macro de  $(net-CS)_F-g-$ . Es posible que esto se deba a la organización de las cadenas injertadas en los hidrogeles, y debido a que la forma de los poros es distinta, las macromoléculas de NVCL injertadas deben acomodarse de manera distinta.

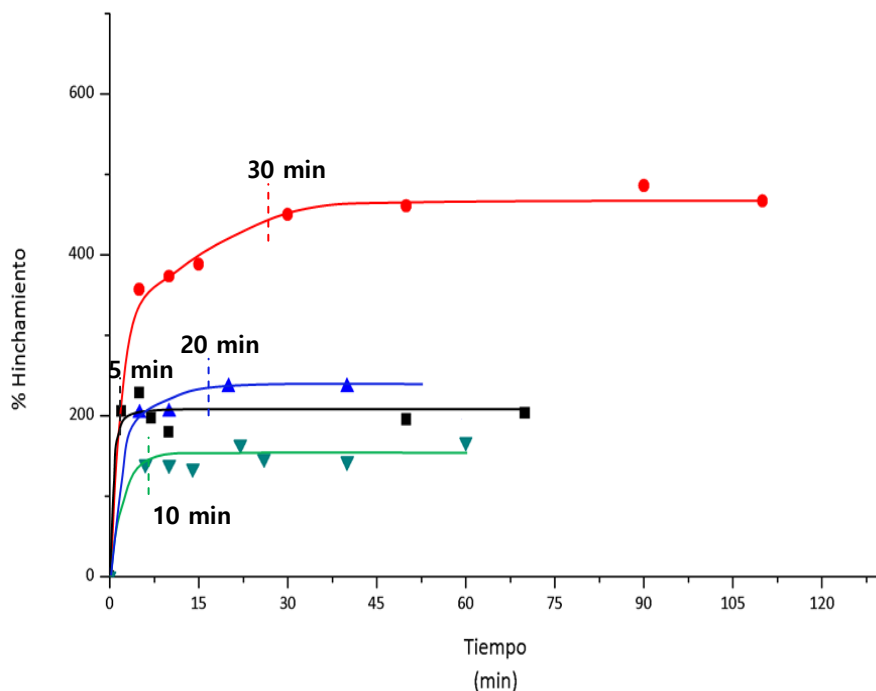


FIGURA 32. Determinación del hinchamiento límite en agua de las nanopartículas con diferente porcentaje de injerto: ●  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 10 %g; ▲  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 12 %g; ▼  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 17 %g; ■  $(net-CS)_n$ .

#### 4.3.2.2. Determinación del pH crítico

Para conocer el pH crítico de los sistemas obtenidos, se sumergieron las muestras en soluciones buffer de fosfatos con valores de pH conocidos (2-11) durante al menos el tiempo de hinchamiento límite en agua (como referencia). Se seleccionaron muestras de nanopartículas y películas de  $(net-CS)$ -g-NVCL que poseyeran porcentajes de injerto similares, para poder hacer una comparación de la respuesta del hidrogel ante el cambio de pH del medio.

Como se sabe, el valor de pH crítico se determina cuando el polímero experimenta drásticamente un cambio de comportamiento de un estado hinchado a un estado colapsado debido a la carga neta que este adquiere; es decir, un polímero que se encuentra hinchado a bajos valores de pH lo hace debido a que posee grupos ionizables –por ejemplo, las aminas que son protonadas en medio ácido- y se colapsa conforme el medio cambia a un valor más básico -las aminas se encontrarían entonces desprotonadas-. En el caso del CS, su respuesta al pH se debe principalmente a que en su estructura posee grupos amino, por lo que su pH de respuesta depende del peso molecular y del grado de desacetilación (Dimitriu, 2002). Para los

hidrogeles reticulados con los que se trabajó, la cantidad de grupos amino disponibles disminuye debido a que el grupo amino del CS reacciona con el grupo aldehído para formar la base de Schiff como se describió anteriormente, por lo que el valor del pH crítico dependerá de lo reticulado del hidrogel. Para ambas gráficas, las líneas representan una guía al ojo del espectador respecto al comportamiento que siguieron los hidrogeles macro y nano al ser sumergidos durante tiempo de hinchamiento límite en soluciones con diferente valor de pH.

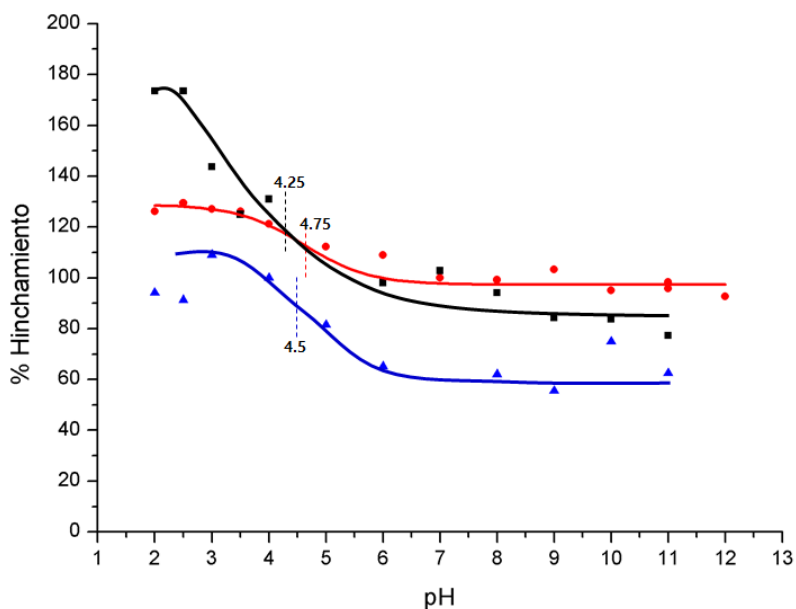


FIGURA 33. Determinación del pH crítico de los macrogeles con diferente porcentaje de injerto: ■  $(net-CS)_F$ ; ●  $(net-CS)_F$ -g-NVCL 12 %g; ▲  $(net-CS)_F$ -g-NVCL 20 %g. (T= 20 °C)

En las películas injertadas (ver Figura 33) el valor de  $pH_c$  obtenido para el hidrogel no injertado fue de 4.25, y para los sistemas injertados se nota un ligero corrimiento del valor hacia valores ligeramente más básicos, siendo 4.75 para hidrogeles con 12 % injerto y 4.5 para las películas con 20 % injerto.

Los valores de pH crítico obtenidos para los nanogeles (ver Figura 34) fueron más ácidos en todos los casos y, de nueva cuenta, el valor de pH crítico más bajo se obtuvo para las nanopartículas no injertadas.

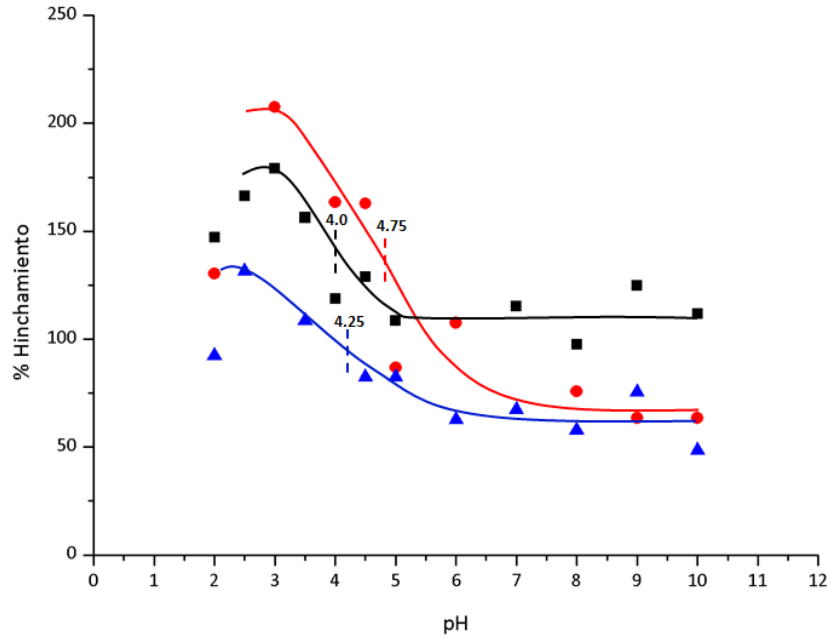
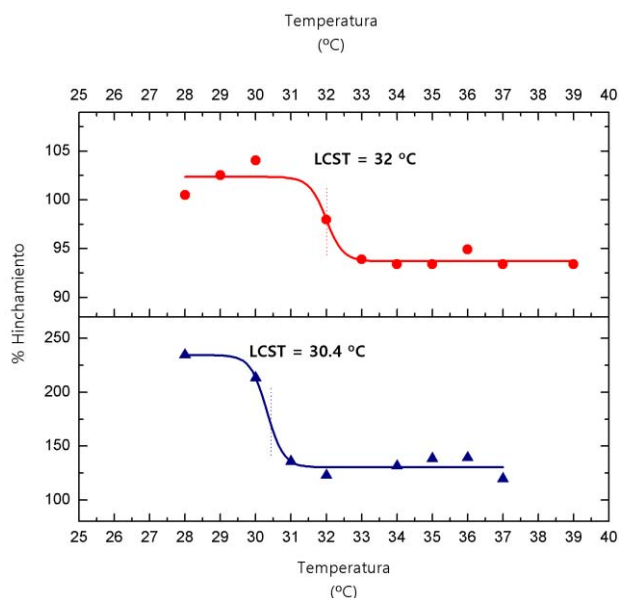


FIGURA 34. Determinación del pH crítico de las nanopartículas variando el porcentaje de injerto: ■  $(net-CS)_n$ ; ●  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 12 %g; ▲  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 17 %g. (T= 20 °C)

#### 4.3.2.3. Determinación de la LCST

La temperatura crítica se determinó sumergiendo las muestras en agua destilada, durante el tiempo de hinchamiento límite. Las siguientes figuras muestran el cambio de carácter de hidrofílico a hidrofóbico conforme la temperatura es incrementada. Este comportamiento se debe a las cadenas injertadas de NVCL en el hidrogel, por lo que solamente fueron objeto de estudio de este experimento los hidrogeles injertados. El intervalo de temperatura en que se ha reportado esta respuesta es alrededor de 32 – 34°C (Cortez-Lemus & Licea-Claverie, 2015 en prensa). Las líneas representan una guía al ojo del espectador respecto al comportamiento que siguieron los hidrogeles nano y macro al ser sometidos al experimento de la determinación de la LCST.



**FIGURA 35.** Determinación de la LCST de los sistemas macro variando el porcentaje de injerto: ●  $(net-CS)_F-g-NVCL$  10 %g; ▲  $(net-CS)_F-g-NVCL$  20 %g.

En los macrogeles se observa que a mayor porcentaje de injerto, la temperatura crítica disminuye (Figura 35). Los valores encontrados fueron 32 °C para una película con 10 % y 30.4°C para un sistema con 20 %. Para las nanopartículas injertadas, los resultados se muestran en la Figura 36 y se observa que se obtuvo un comportamiento similar, ya que un sistema con 12% presenta una LCST en 32.9 °C mientras que uno con 25 % tiene una respuesta en 30.9 °C; este comportamiento podría explicarse si se toma en cuenta que a mayor cantidad de NVCL, la hidrofobicidad del sistema aumenta, desplazándose la temperatura crítica hacia valores menores debido a que la contribución de la cadena hidrocarbonada del monómero injertado es mayor que la contribución del polar de la caprolactama que confiere la hidrofiliidad al sistema.



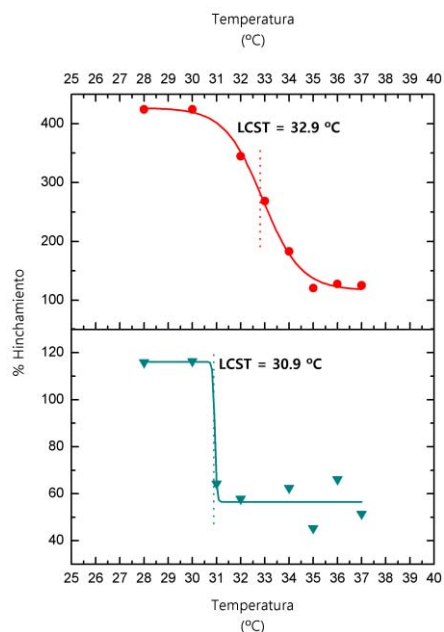


FIGURA 36. Determinación de la temperatura crítica de las nanopartículas con porcentaje de injerto: ●  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 12 %g; ▼  $(net-CS)_n$ -g-NVCL 25 %g.

### 4.3.3. Análisis termogravimétrico

El estudio de TGA mostró la estabilidad térmica de los sistemas sintetizados y al mismo tiempo fue útil para confirmar el injerto de la NVCL en los hidrogeles irradiados.

La Figura 37 muestra las curvas termogravimétricas de: a. CS, donde lo primero se aprecia es la pérdida de agua, seguido por una destacada caída que muestra la desacetilación y depolimerización según la literatura (de Britto & Capana-Filho, 2007), proceso que prácticamente se produce en un solo paso; la curva b. muestra el comportamiento frente a la temperatura de  $(net-CS)$ , esta curva muestra estabilidad térmica de la red hasta los 233.8 °C, donde el hidrogel se descompone; en tanto, c. corresponde a la PNVCL donde se puede ver una caída inicial debida a la pérdida de agua y una segunda caída en 410.8 °C que se debe a la descomposición por depolimerización de la PNVCL; la curva d. por su parte muestra que el copolímero de injerto  $(net-CS)_F$ -g-NVCL en película, se descompone más rápidamente sufriendo una pérdida dramática en peso a 227 °C y una segunda pérdida a 401 °C, que confirma la presencia de la NVCL; finalmente, e. es la curva de degradación térmica de  $(net-CS)_n$ -g-NVCL a nivel nano, donde se pierde en primera instancia la humedad presente en el sistema y posteriormente la descomposición del sistema en dos pasos, primero la del CS y

posteriormente la de la NVCL injertada, de manera similar a lo que ocurre en los sistemas macro.

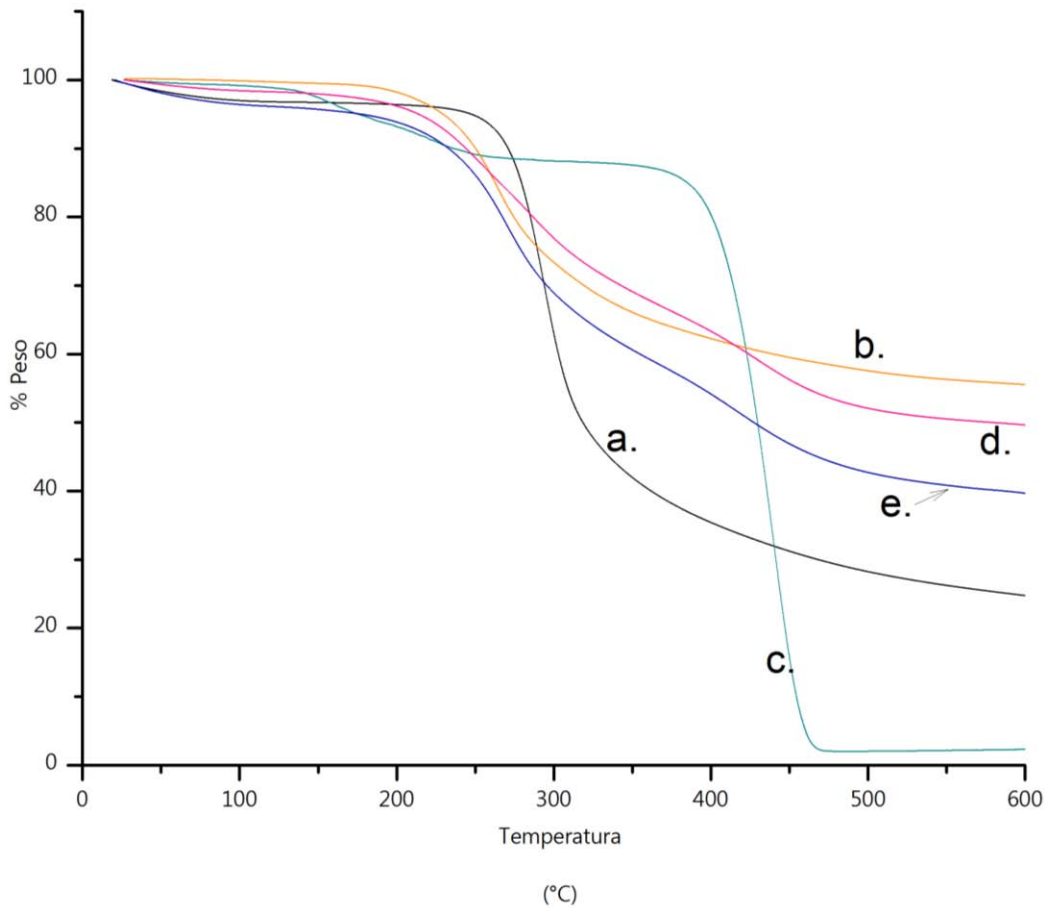


FIGURA 37. Termogramas de los sistemas estudiados: a. CS; b. *net-CS*; c. PNVCL; d.  $(net-CS)_F-g-NVCL$  macro; e.  $(net-CS)_n-g-NVCL$  nano.

A continuación se muestran las temperaturas de las caídas obtenidas de los puntos de inflexión de las curvas ( $T_d$ ), la que marca la pérdida del 10% del peso inicial de la muestra y el porcentaje de muestra residual a 600 °C de los sistemas.

Tabla 4. Temperaturas de degradación características de los sistemas obtenidos.

Sistema	$T_d$ (°C)	$T_{10\%}$ pérdida peso (°C)	%Residuo @600°C
CS	293.9	270.8	24.7
PNVCL	227.6	236.2	2.3

	439,9		
<i>net-CS</i>	264.5	250.4	55.5
<i>(net-CS)-g-NVCL</i> 21 %g Macro	227.7	227.9	27.0
<i>(net-CS)-g-NVCL</i> 26 %g Nano	270.6	232.6	39.7
	416.6		

#### 4.3.4. Microscopía Electrónica de Barrido

Se realizaron micrografías a las películas de CS reticulado para saber si su superficie se modificaba al injertar la NVCL. La Figura 38 muestra las micrografías para las películas injertadas, puede notarse que el injerto modifica muy ligeramente la superficie de éstas.

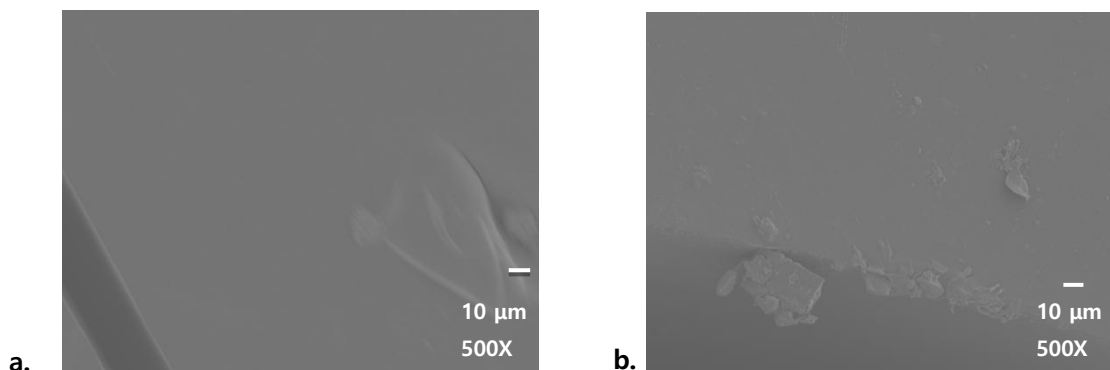


FIGURA 38. Imágenes SEM de los macrogeles de quitosano. a. *net-CS*. b. *(net-CS)-g-NVCL* 8.5 %g.

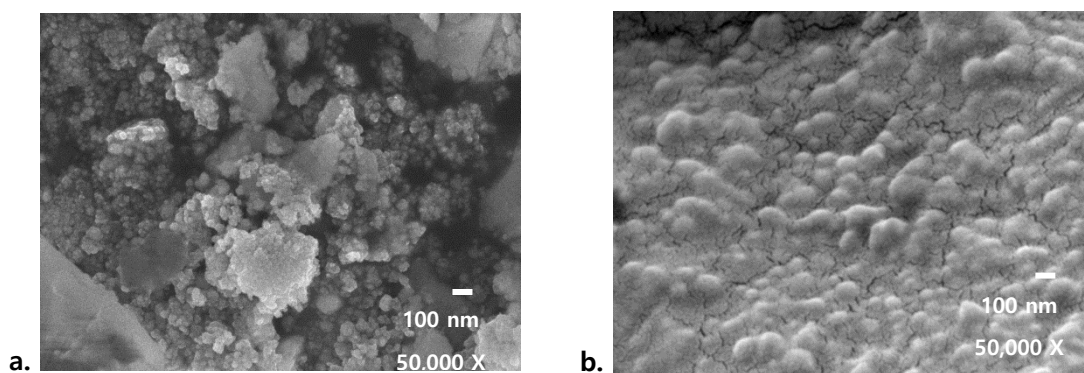
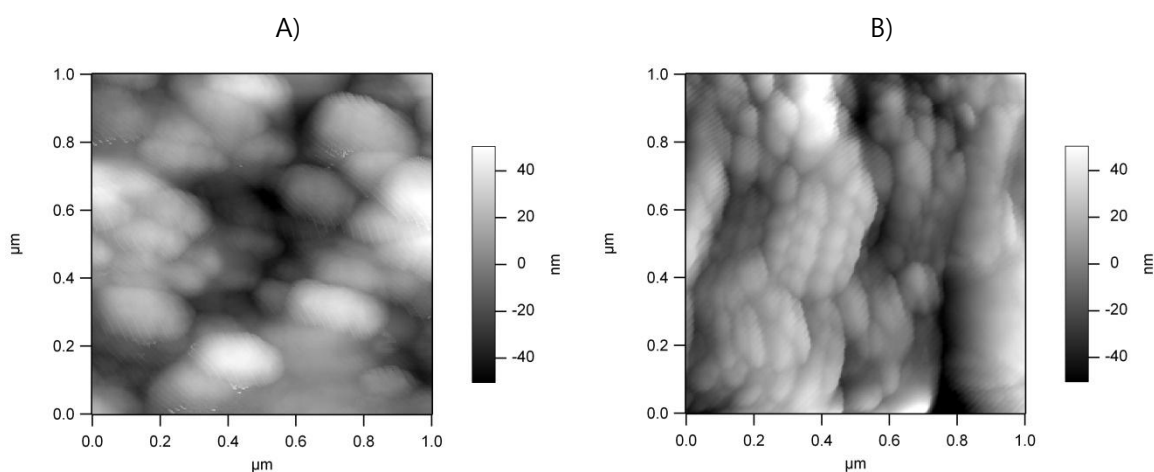


FIGURA 39. Imágenes SEM de nanogeles de quitosano. a. *net-CS*. b. *(net-CS)<sub>n</sub>-g-NVCL* 15 %g.

Las micrografías de los nanogeles (Figura 39) fueron no proporcionaron suficiente información, por tanto, se decidió analizar los nanogeles por la técnica de AFM, debido a que esta brinda información sobre la morfología de las muestras cuando forma agregados y nos permite medir el tamaño de partícula de la muestra en seco; los macrogeles no pueden ser analizados por esta técnica debido a que pueden romper las puntas con las que se realiza el estudio, por lo que para analizar la superficie de estos se decidió utilizar Microscopía láser confocal, la cual nos brindó más información sobre la rugosidad de los macrogeles una vez que la NVCL es injertada en las películas (*net-CS*)<sub>F</sub>.

#### 4.3.5. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)



**FIGURA 40.** Micrografías de AFM de los nanogeles sintetizados. A) *net-CS*; b) (*net-CS*)-g-NVCL 12.5 %g. Las líneas transversales son ruido.

Como se mencionó anteriormente, las imágenes de SEM mostraron que los nanogeles se agrupan y forman agregados, se decidió conocer su morfología con la técnica de AFM. La Figura 40 reveló un tamaño de partícula más cercano al que tienen los geles en condiciones secas. Después de haber fijado las partículas a una lámina de vidrio con pasta de plata, se procedió a realizar el experimento. La escala de altura en ambas imágenes de 100 nm.

Las micrografías mostraron que para los nanogeles sin injertar (*net-CS*) el tamaño de partícula promedio fue de  $65.0 \pm 15.9$  nm y para los nanogeles injertados (*net-CS*)-g-NVCL el tamaño se reduce a  $37.1 \pm 6.9$  nm. La reducción del tamaño de partícula puede ser atribuida al efecto de la

radiación en los nanogeles, es decir a la degradación que pudo haber sufrido el hidrogel disolviéndose en los lavados posteriores al injerto.

#### 4.3.6. Microscopía láser confocal

Debido a que las imágenes de SEM proporcionaron poca información sobre la homogeneidad de la superficie de las películas y la forma en cómo se encuentra injertada la NVCL, se realizaron pruebas de microscopía láser confocal. Las siguientes imágenes (Figura 36) muestran una pequeña parte de la superficie de las películas injertadas con diferente amplificación. Mediante esta técnica es claro ver que se llevó a cabo con éxito el injerto de la NVCL sobre la película debido al cambio de homogeneidad que sufre su superficie, pues se observa mayor heterogeneidad como lo confirma el perfil transversal que se tomó del material y que se muestra en la parte inferior en (C. y D.) de la Figura 41.

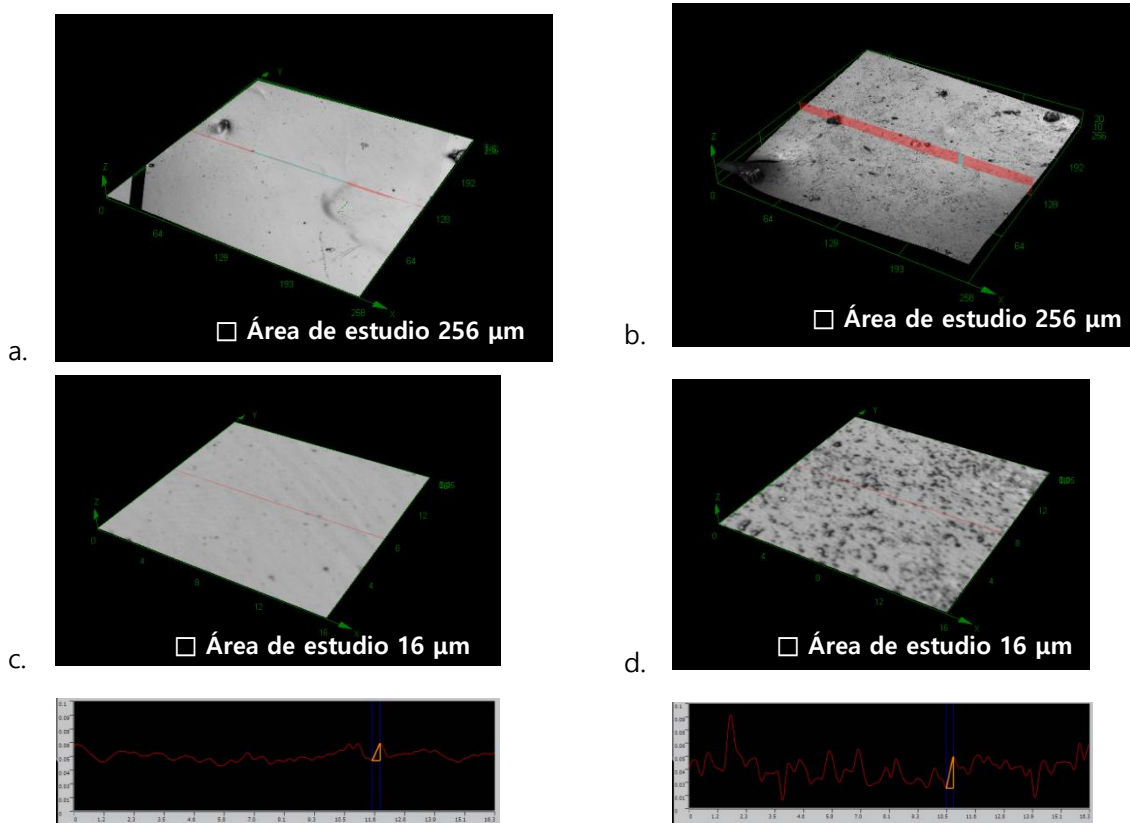


FIGURA 41. Imágenes 3D de las microscopías láser confocal de las películas de la red de quitosano. a. y c. *net-CS*; b. y d. *(net-CS)-g-NVCL* con 8.5% de injerto. En la parte inferior de c. y d. se muestra un perfil transversal de la superficie de las películas.

#### 4.4. Ensayos de carga y liberación de 5-FU

Los sistemas sintetizados fueron diseñados para su potencial uso como posibles agentes acarreadores de fármacos de forma que el material presentara las ventajas de ser biodegradable, no tóxico y la liberación se llevara a cabo de forma controlada y bajo parámetros específicos (a cierto valor de pH y determinada temperatura). La estructura de la matriz polimérica (un polímero catiónico) y la incorporación de la NVCL en el sistema, sugieren que puede haber interacciones electrostáticas, por puentes de hidrógeno y/o iónicas que permitan retener fármacos en los sistemas mediante estas interacciones. Por su parte, la cesión del fármaco estará controlada básicamente gracias a sus propiedades estímulo sensibles, por lo que esta será localizada y controlada.

Las nanopartículas sintetizadas son sistemas de particular interés ya que se sabe que los capilares sanguíneos más pequeños rondan los 4  $\mu\text{m}$ , por lo que los sistemas podrían ser inyectados de forma intravenosa, facilitando y acelerando el transporte del fármaco, aunque también cabe la posibilidad de ser administrados por vías subcutánea e intramuscular, disminuyendo la irritación en el sitio de la inyección, protegiendo al fármaco de la degradación enzimática (Tiyaboonchai, 2003). Por su parte, las películas y membranas de ciertos hidrogeles han sido ampliamente utilizadas en la liberación transdérmica de fármacos (Yao, Li, Yao, & Yin (Editores), 2012).

El 5-FU es un anticancerígeno muy utilizado en la terapia contra esta enfermedad. Puede ser utilizado en diversos tipos de cáncer como son el de mama, esófago, estómago, piel, colon y recto. Para el caso de cáncer de piel, frecuentemente se administra de forma tópica, mientras que en los demás casos puede introducirse en el organismo por una inyección del medicamento disuelto. Dicho lo anterior, para el caso del cáncer de piel, las películas de CS podrían ser utilizadas en la queratosis actínica (lesiones cutáneas provocadas por la exposición al sol en su mayoría) y los nanogeles como soluciones intravenosas. Con base en lo anterior, se procedió a los ensayos de carga y cesión de fármaco.

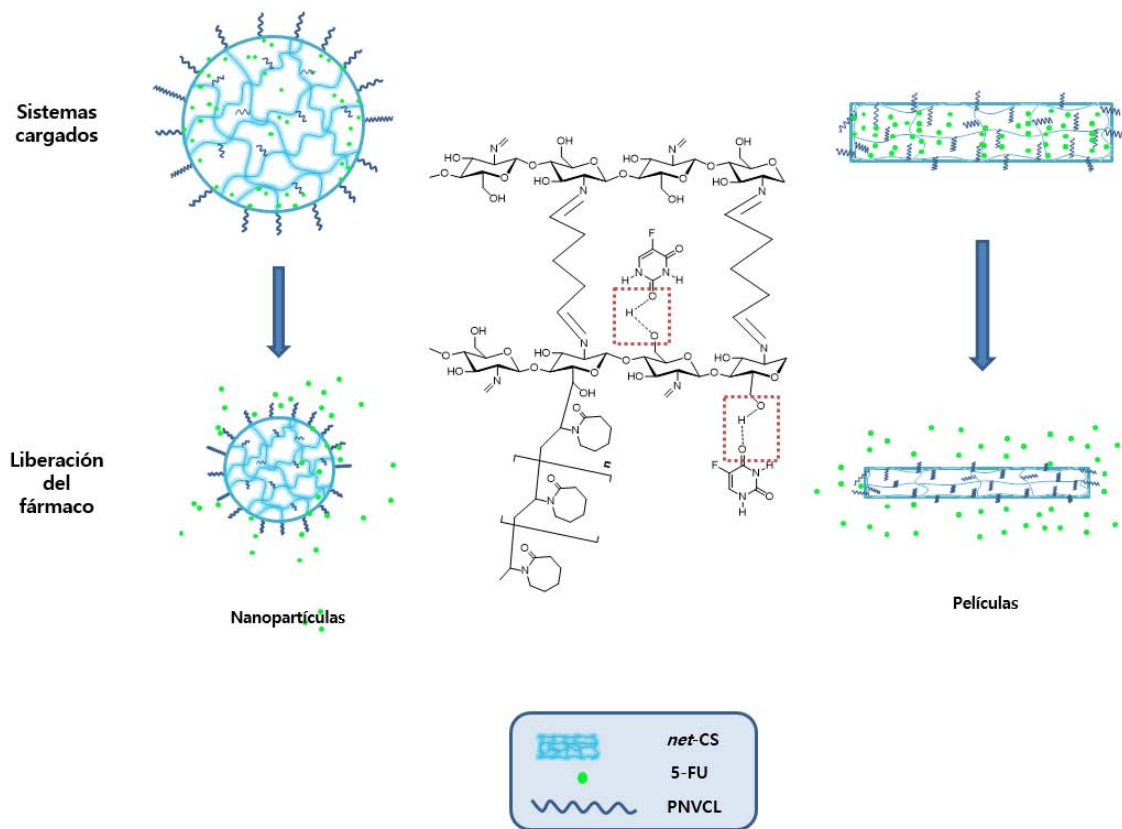


FIGURA 42. Representación esquemática de la carga y liberación del 5-FU en los sistemas sintetizados.

La Figura 42 esquematiza la posible forma de interacción entre los hidrogeles en ambas escalas y el fármaco 5-FU.

#### 4.4.1. Carga de 5-FU

La carga del 5-FU en los hidrogeles en ambas escalas se realizó sumergiendo una muestra del hidrogel en una cantidad conocida de disolución del fármaco (experimento que se llevó a cabo por triplicado) y con un blanco negativo del sistema como referencia. Con el fin de analizar si el porcentaje de injerto de NVCL influía en la cantidad y velocidad de carga, en los sistemas macro se tomó un gel con 10 y 20% de injerto.

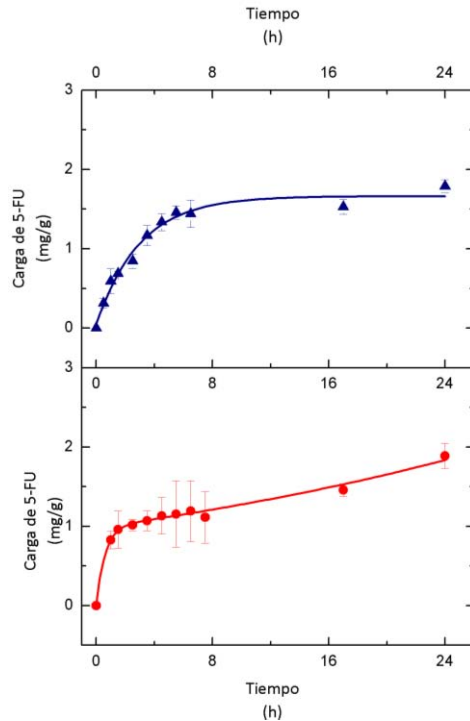


FIGURA 43. Perfil de carga de 5-FU en los macrogeles con: ●  $(net-CS)_F$ -g-NVCL 10%; ▲  $(net-CS)_F$ -g-NVCL 20 %  
g.

La Figura 43 muestra el perfil de carga de 5-FU cuantificado mediante espectroscopia UV-VIS para los macrogeles de  $(net-CS)_F$ -g-NVCL. Puede verse que para se retiene aproximadamente la misma cantidad de fármaco en los sistemas sin importar la cantidad de injerto, por lo que los porcentajes reportados no muestran un cambio significativo en la cantidad de retención del 5-FU ni en el tiempo total de carga. Las muestras fueron retiradas del experimento de carga después de 24 horas.



En lo que corresponde a las nanopartículas de CS injertadas (Figura 44), como podían sugerir los valores de hinchamiento límite, la carga se concluye en un tercio del tiempo en que lo efectúan las películas macro. El efecto de la cantidad de monómero injertado respecto a la cantidad de fármaco cargado y el tiempo en que se alcanza este máximo es menor comparado con el caso de las películas de *net*-CS (8 h contra 24 h). No obstante, el comportamiento muestra que tampoco hay un cambio notable en la cantidad de fármaco retenido en el sistema, por lo que puede concluirse que la cantidad de NVCL injertada en los sistemas en cualquiera de las escalas no hace alguna diferencia.

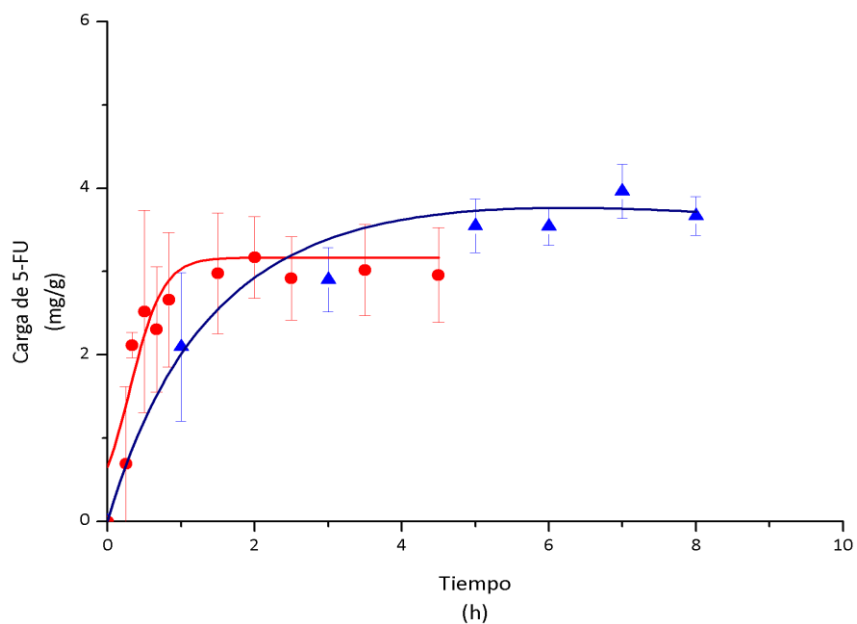
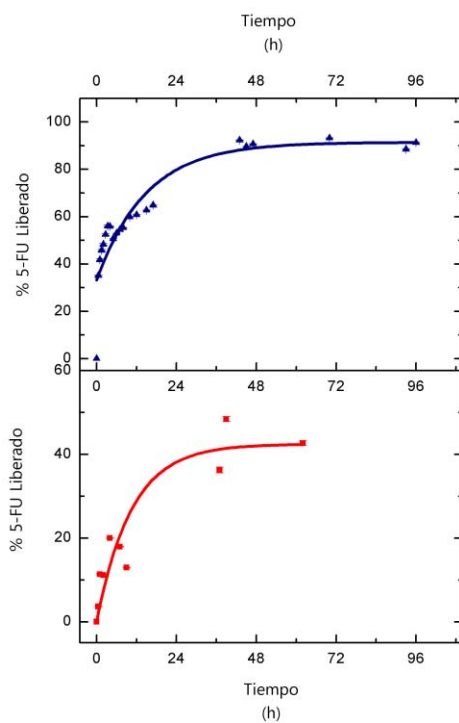


FIGURA 44. Perfil de carga de las nanopartículas de CS con diferentes porcentajes de injerto. ● (*net*-CS)<sub>n</sub>-g-NVCL 12 % g; ▲ (*net*-CS)<sub>n</sub>-g-NVCL 17 % g.

#### 4.4.2. Liberación de 5-FU

La liberación del 5-FU procedió después de que los geles (en todos los casos) fueron retirados de la disolución con fármaco y posteriormente secados por liofilización. Las muestras cargadas con 5-FU fueron colocadas en frascos ámbar con agua grado milli-Q con pH 6.2, a 36 °C; se monitoreó la liberación del fármaco mediante espectroscopia UV-Vis ( $\lambda=266$  nm) y se cuantificó la cantidad de fármaco liberado en el medio. A continuación se muestran los resultados obtenidos.



**FIGURA 45.** Perfil de liberación del fármaco 5-FU de las películas de CS (macrogeles) con distinto porcentaje de injerto: ●  $(net-CS)_F-g-NVCL$  10 % g; ▲  $(net-CS)_F-g-NVCL$  20 % g.

Las películas de  $(net-CS)_F-g-NVCL$  muestran una liberación prolongada del fármaco, debido a que el tiempo es mucho mayor a las 8 horas necesarias para que un sistema entre en esta clasificación, alcanzando su máximo a las 48 h. La Figura 45 también muestra que la cantidad de fármaco liberado es mayor en películas con mayor porcentaje de injerto (20 %g) y se observa que el porcentaje de fármaco liberado es mayor del 90% del cargado. Asimismo, la cantidad de fármaco para los macro  $(net-CS)_F-g-NVCL$  con 10 %g fue solamente del 40%, esto podría explicarse debido probablemente a que a mayor cantidad de NVCL injertada; o sea que

existe una mayor facilidad para liberar el fármaco porque el 5-FU no penetra tan profundamente en la matriz.

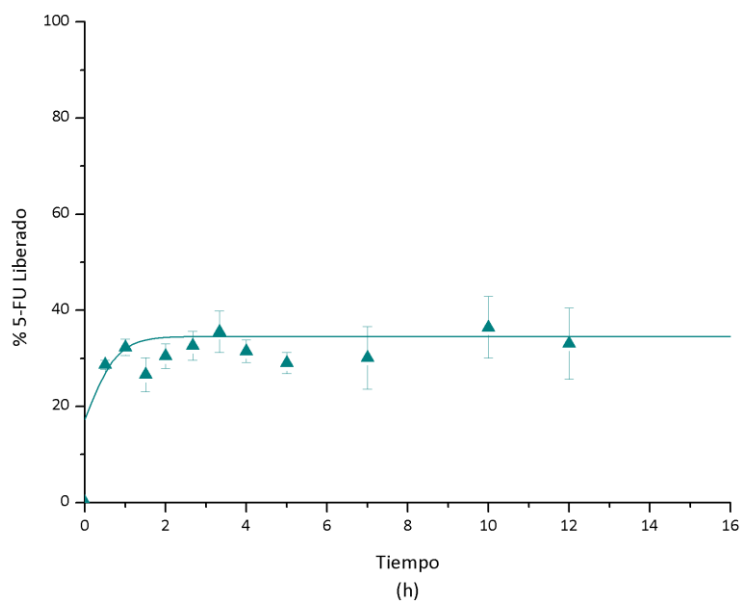


FIGURA 46. Perfil de liberación del fármaco 5-FU en nanogeles de  $(net-CS)_n$ -g-NVCL con  $\blacktriangle$  17 % g.

Para los nanogeles de CS injertados  $(net-CS)_n$ -g-NVCL con 17% de NVCL (Figura 46) se observa una notable diferencia en el tiempo de liberación, donde este es prácticamente alcanzado al cabo de una hora, lo que tiene sustento en la rápida respuesta de hinchamiento. La cantidad de fármaco liberado es del 40% del retenido, debido probablemente al tamaño y forma de poro que se tiene en los geles de tipo nanométrico. Podría concluirse que en poros de menor tamaño, la liberación del 5-FU es más difícil.

## 5. CONCLUSIONES

Los hidrogeles de CS entrecruzados fueron injertados con NVCL mediante radiación gamma por el método directo, de manera que se obtuvieron porcentajes de injerto de 5-22% para las películas (macrogeles) y de 4-33% para las nanopartículas (nanogeles).

Los sistemas sintetizados presentaron tanto respuesta al pH, cuyos valores se encontraron en valores ácidos (4-4.7), como a la temperatura, con valores entre los 30-33 °C, por lo que son considerados sistemas estímulo-sensibles.

La cinética de carga de los macrogeles de  $(net-CS)_F-g-NVCL$  mostró que la cantidad máxima de fármaco 5-FU absorbida fue de 2 mg/g, mientras que para los nanogeles  $(net-CS)_n-g-NVCL$  se absorbió un máximo de 4 mg/g.

La liberación de 5-FU se llevó a cabo a una temperatura de 36.°C y pH de 6, y se observó que los macrogeles alcanzaron un máximo de liberación del fármaco hasta 48 h después de haber iniciado el experimento. Por otro lado, las nanopartículas liberaron el fármaco en 1 h.

Los porcentajes de injerto obtenidos en las nanopartículas fueron mayores debido a la cantidad de área disponible para el injerto, la cual es mucho mayor en los nanogeles que la disponible en las películas de macrogeles (área macro << área nano).

El tiempo de respuesta respecto al hinchamiento límite, y la cantidad de fármaco cargado y liberado en los sistemas macro fue diferente al de las nanopartículas de  $(net-CS)-g-NVCL$  (2 contra 4 mg/g, respectivamente), debido a la influencia del tamaño de tamaño de poro y área disponible en los nanogeles.

Los tamaños de partícula obtenidos para los nanogeles de  $(net-CS)_n-g-NVCL$  por medio de DLS (<200 nm) sugieren que estos podrían ser utilizados como acarreadores de fármacos ya que son mucho menores que los vasos capilares sanguíneos. El tamaño de las nanopartículas en estado seco se determinó por medio del análisis de AFM.

Los ensayos de carga y cesión de fármaco fueron una prueba de que los sistemas efectivamente poseen la capacidad de retener y liberar fármacos y abren la posibilidad de experimentar con otros medicamentos de los cuales se pueda retener una mayor cantidad del mismo en el sistema.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* , 6, 105–121.
- Akhtar, M. F., Hanif, M., & Ranjha, N. M. (2015, en prensa). Methods of synthesis of hydrogels... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* .
- Akhtar, M., Hanif, M., & Ranjha, N. (2015). Introduction to smart polymers ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* .
- Anitha, A., Deepa, N., Chennazhi, K., Lakshmanan, V.-K., & Jayakumar, R. (2014). Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded thiolated chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1840, 2730–2743.
- Anton, N., & Vandamme, T. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res* , 28, 978-985.
- Arteche Pujana, M., Pérez-Álvarez, L., Cesteros Iturbe, C., & Katime, I. (2014). Water soluble folate-chitosan nanogels crosslinked by genipin. *Carbohydrate Polymers* , 101, 113–120.
- Arteje Pujana, M., Pérez-Álvarez, L., Cesteros Iturbe, C., & Katime, I. (2012). Water dispersible pH-responsive chitosan nanogels modified with biocompatible crosslinking agents. *Polymer* , 53, 3107-3116.
- Bemmelen, J. M. (1896). Der Hydrogel und das kristallinische Hydrat des Kupferoxydes. *Néerl.* , 30, 1-24.
- Benavides Rodríguez, L., Sibaja Ballesterero, M., Vega-Baudrit, J., Camacho Elizondo, M., & Madrigal Carballo, S. (2010). Estudio cinético de la degradación térmica de la Quitina y Quitosano de Camarón de la especie "Heterocarpus vicarius" empleando la técnica termogravimétrica en modo dinámico. *Rev. Iberoam. Polím.* , 11 (7), 558-573.
- Bhattacharya, A., & Misra, B. (2004). Grafting: a versatile means to modify polymers. Techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* , 29, 767-814.
- Bhattacharya, A., Rawlins, J. W., Ray, P., & (Editores). (2009). *Polymer Grafting and Crosslinking*. New Jersey, Estados Unidos: Wiley .
- Blanco, D., García, O., Trigo, R., Tejjón, J., & Katime, I. (1996). 5-Fluorouracil release from copolymeric hydrogels of itaconic acid monoester. *Biomaterials* , 17, 1061-1067.
- Buwalda, S., Boere, K., Dijkstra, P., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials . *Journal of Controlled Release* , 190, 254–273.
- Cambridge Display Technology. (9 de Diciembre de 2015). *Cambridge Display Technology*. Obtenido de <https://www.cdtltd.co.uk/>
- Chapiro, A. (1962). *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*. Gran Bretaña: Interscience Publishers.

- Charlesby, A. (. (1990). Molecular Weight Changes and Network Formation by Scission and Crosslinking. En O. Güven, *Crosslinking and Scission in Polymers* (págs. 1-13). Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers.
- Charlesby, A. (1960). *Atomic Radiation and Polymers*. Oxford, Inglaterra: Pergamon Press.
- Chen, L., Tian, Z., & Du, Y. (2004). Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices. *Biomaterials* , 25, 3725-3732.
- Chen, R., & Hwa, H.-D. (1996). Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers* , 26, 353-358.
- Cheng, C., & Pich, A. (2012). Poly(N-Vinylcaprolactam) Nano- and Microgels. En L. A. Edited by Lyon, *Hydrogel Micro and Nanoparticles* (págs. 117-139). Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Chiou, S.-H., & Wu, W.-T. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials* , 25(2), 197-204.
- Chitosan for mucosal vaccination2001 *Advanced Drug Delivery Reviews* 52, 139-144
- Chmielewski, A. G. (2010). Chitosan and radiation chemistry. *Radiation Physics and Chemistry* , 79, 272-275.
- Chmielewski, A., Migdal, W., Gryczka, U., & Starosta, W. (s.f.). Chemical-Radiation Degradation of Natural Polysaccharides (Chitosan). *Radiation Chemistry and Physics, Radiation Technologies* , 42-44.
- Clark, E., & Lipson, J. (2012). LCST and UCST behavior in polymer solutions and blends. *Polymer* , 53, 536-545.
- Cordes, E. H., & Jencks, W. P. (1962). On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* , 84 (5), 832–837.
- Cortez-Lemus, N. A., & Licea-Claverie, A. (2015 en prensa). Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Progress in Polymer Science* .
- Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Progress on Chemical and Application of Chitin and its Derivatives* , XVII, 5-20.
- de Alvarenga, E. S. (2011). Characterization and Properties of Chitosan. En M. Elnashar, & (Ed.), *Biotechnology of Polymers* (págs. 91-108). Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biotechnology-of-biopolymers/characterization-and-properties-of-chitosan>: InTech.
- de Britto, D., & Campana-Filho, S. (2007). Kinetics of the thermal degradation of chitosan. *Thermochimica Acta* , 465, 73–82.

- de Britto, D., & Capana-Filho, S. P. (2007). Kinetics of the thermal degradation of chitosan. *Thermochimica Acta* , 465, 73-82.
- de Pablo, P. J. (2011). Introduction to Atomic Force Microscopy. En E. J. Peterman, G. J. Wuite, & (Editores), *Single Molecule Analysis. Methods and Protocols* (págs. 197-212). New York: Humana Press.
- Dimitriu, S. (. (2002). *Polimeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekked, Inc.
- Duan, C., Zhang, D., Wang, F., Zheng, D., Jia, L., Feng, F., y otros. (2011). Chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) based nanogels for tumor extracellular targeting. *International Journal of Pharmaceutics* , 409, 252-259.
- Elisseeff, J. (2008). Hydrogels: Structure starts to gel. *Nature Materials* , 7, 271 - 273.
- El-Nokaly, M. A., Piatt, D. M., & Charpentier, B. A. ((Editores), 1993). *Polymeric Delivery Systems. Properties and Applications*. Washington, D. C.: ACS Symposium Series.
- Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. (2012). New York: Springer.
- Geisse, N. A. (2009). AFM and combined optical techniques. *Materials today* , 12(7-8), 40-45.
- Gil, E., & Hudson, S. (2004). Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* , 29, 1173–1222.
- Goy, R. C., de Britto, D., & Assis, O. B. (2009). A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* , 19 (3), 241-247.
- Gryczka, U., Dondi, D., Chmielewski, A. G., Migdal, W., Buttafava, A., & Faucitano, A. (2009). The mechanism of chitosan degradation by gamma and e-beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* , 78, 543–548.
- Gupta, P., Vermani, K., & Garg, S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *DDT* , 7(10), 569-579.
- Hamidia, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 60, 1638–1649.
- Hoffmann, B., Seitz, D., Mencke, A., Kokott, A., & Ziegler , G. (2009). Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med* , 20, 1495-1503.
- Honey, P., Rijo, J., Anju, A., & Anoop, K. (2014). Smart polymers for the controlled delivery of drugs - a concise overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B* , 4(2),120–127.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R., & Mano, J. (2005). Graft copolymerized chitosan— present status and applications. *Carbohydrate Polymers* , 62, 142–158.
- Kozanoğlu, S., Özdemir, T., & i Usanmaz, A. (2011). Polymerization of N-Vinylcaprolactam and Characterization of Poly(N-Vinylcaprolactam). *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* , 48, 467–477.
- Kulshrestha, A. S., & Mahapatro, A. ((Editores), 2008). Polymers for Biomedical Application. En *Polymers for Biomedical Application* (págs. 1-7). Washington, DC: ACS.

- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I., & Mattiasson, B. (2007). Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* , 32, 1205–1237.
- Li, B., Shan, C.-L., Zhou, Q., Fang, Y., Wang, Y.-L., Xu, F., y otros. (2013). Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde. *Mar. Drugs* , 11, 1534-1552.
- Li, N., & Bai, R. (2005). A Novel Amine Shielded Surface Cross-Linking of Chitosan Hydrogel Beads for Enhanced Metal Adsorption Performance. *Ind. Eng. Chem. Res.* , 44, 6692-6700.
- Liu, J., Debuigne, A., Detemblemur, C., & Jérôme, C. (2014). Poly( N-vinylcaprolactam): A Thermoresponsive Macromolecule with Promising Future in Biomedical Field. *Adv. Healthcare Mater.* , 3, 1941–1968.
- Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A., y otros. (2014). pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances* , 32, 693–710.
- Longley, D., Harkin, D., & Johnston, P. (2003). 5-Fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nature* , 3, 330-336.
- Mah, E., & Ghosh, R. (2013). Thermo-Responsive Hydrogels for Stimuli-Responsive Membranes. *Processes* , 1, 238-262.
- Manirujjman2013An Overview of Nanogel Drug Delivery System *Journal of Applied Pharmaceutical Science* S-95-S105
- Maza Mejía, I., & Jacinto Hernandez, C. (2007). Caracterización Físicoquímica de Quitosano para su aplicación como Biosorbente de Metales. *REVCIUNI* , 11(1), 1-5.
- McClements, D. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* , 8, 1719-1729.
- Meléndez-Ortiz, H. I., & Bucio, E. (2015). Synthesis, Characterization, and Uses of Novel-Architecture Copolymers through Gamma Radiation Technique. En A. Tiwari, & L. (. Uzun, *Advanced Functional Materials* (pág. 600). New Jersey, EUA: Scrivener Publishing.
- Meléndez-Ortiz, H. I., Bucio, E., Isoshima, T., Ito, H., & Hara, M. (2010). Surface Morphology of Radiation-Grafted Binary Copolymers Measured in Buffer Solution under Swelling Condition. *Japanese Journal of Applied Physics* , 49, 01AF02.
- Mitani, T., Fukumuro, N., Yoshimoto, C., & Ishii, H. (1991). Effects of Counter Ions (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and Cl<sup>-</sup>) on the Adsorption of Copper and Nickel Ions By Swollen Chitosan Beads. *Agric. Biol. Chem.* , 5, 2419.
- Moad, G., & Solomon, D. H. (2006). *The Chemistry of Radical Polymerization. Second fully revised edition*. Oxford: Elsevier.
- Molecular Info®. (20 de Agosto de 2015). *Thermo Spectronic. Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications*. Obtenido de <http://www.molecularinfo.com/MTM/UV.pdf>
- nanoScience instruments. (19 de Noviembre de 2015). *nanoScience instruments*. Obtenido de <http://www.nanoscience.com/products/sem/technology-overview/sample-electron-interaction/>



- Navarrete, M., & Cabrera, L. (1993). *Introducción al estudio de los radioisótopos*. Distrito Federal, México: Porcia Editores.
- Norwegian Institute of Public Health. (27 de Agosto de 2014). *WHO Collaborating Centre for Drug Statics Methodology*. Obtenido de [http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=L01BC02&showdescription=yes](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=L01BC02&showdescription=yes)
- Oh, J. K., Ik Lee, D., & Myung Park, J. (2009). Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 34, 1261-1282.
- Oh, J., Drumright, R., Siegwart, D., & Matyjaszewski, K. (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.*, 33, 448-477.
- Ortiz, R., Prados, J., Melguizo, C., Arias, J. L., Ruiz, M. A., Álvarez, P. J., y otros. (2012). 5-Fluorouracil-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles combined with phage Egene therapy as a new strategy against colon cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 95-107.
- Park, S.-I., Kwak, I., Won, S., & Yun, Y.-S. (2013). Glutaraldehyde-crosslinked chitosan beads for sorptive separation of Au(III) and Pd(II): Opening a way to design reduction-coupled selectivity-tunable sorbents for separation of precious metals. *Journal of Hazardous Materials*, 211-218.
- Pasanphan, W., Rimdusit, P., Choofong, S., Piroopan, T., & Nilsuwankosit, S. (2010). Systematic fabrication of chitosan nanoparticle by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 70, 1095-1102.
- Patel, H., & Patel, J. (2010). Nanogel as a controlled delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(2), 37-41.
- Perkin Elmer. (18 de Septiembre de 2015). *Technical Note. FT-IR Spectroscopy*. Obtenido de [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)
- Petrova, M. (24 de marzo de 2014). *ACS Network*. Obtenido de Sitio web de la American Chemical Society: <https://communities.acs.org/community/science/sustainability/green-chemistry-nexus-blog/blog/2014/03/24/the-many-faces-of-biopolymers>
- Poon, L., Wilson, L., & Headley, J. (2014). Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. *Carbohydrate Polymers*, 109, 92-101.
- Principles of Polymerization* 2004 New Jersey Wiley-Interscience
- Pujana Arteché, M., Pérez-Álvarez, L., Cesteros Iturbe, L. C., & Katime, I. (2013). Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 94, 836-842.
- Ramos, J., Imaz, A., & Forcada, J. (2012). Temperature-sensitive nanogels: poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide). *Polym. Chem.*, 3, 852-856.
- Raoa, K., Mallikarjunaa, B., Raob, K., Siraja, S., Raoc, K., & Subha, M. (2013). Novel thermo/pH sensitive nanogels composed from poly(N-vinylcaprolactam) for controlled release of an anticancer drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 891-897.
- Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 362-369.

- Rejinold, N. S., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2011). Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. *Carbohydrate Polymers* , 83, 776–786.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* , 31, 603-632.
- Rudin, A. (1998). *The Elements of Polymer Science and Engineering. An Introductory Text and Reference for Engineers and Chemists*. San Diego: Academic Press.
- Samal, S. K., Dash, M., Dubrueland, P., & Van Vlierberghe, S. (2014). Smart polymer hydrogels: properties, synthesis and applications. En M. R. Aguilar, & J. (. San Román, *Smart Polymers and their Applications* (págs. 237-270). Cambridge, UK: Woodhead.
- Sánchez B, A., Sibaja B, M., Vega-Baudrit, J., & Madrigal C, S. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir de camarón langostino (Pleuroncodes Planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Rev. Iberoam. Polím.* , 8 (4), 241-267.
- Singh, A., Narvi, S. S., Dutta, P. K., & Pandey, N. D. (2006). External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mat. Sci.* , 239(6),233-238 .
- Svenson, S., & (Editor). (2005). *Polymeric Drug Delivery II. Polymeric Matrices and Drug Particle Engineering*. Washington, D. C.: ACS SYMPOSIUM SERIES.
- Swallow, A. J. (1960). *Radiation Chemistry of Organic Compounds*. Oxford, Inglaterra: Pergamon Press.
- Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release2009*Carbohydrate Polymers* 75, 222-229
- Tiyaboonchai, W. (2003). Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal* , 11(3), 51-66.
- U.S. Congress, O. o. (September de 1993). *Biopolymers: Making Materials Nature's Way* , 1-50. Washington, D.C., USA: U. S. Government Printing Office.
- Vihola, H., Laukkanen, A., Tenhu, H., & Hirvonen, J. (2011). Drug Release Characteristics of Physically Cross-Linked Thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Hydrogel Particles. *J. Pharm. Sci.* , 97 (11), 4783-4793.
- Wang, J., Zeng, Z., Xiao, R., Xie, T., Zhou, G., Zhang, X., y otros. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine* , 6, 765–774.
- Wang, Q., Du, Y.-m., & Fan, L.-h. (2005). Properties of Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Films for Drug-Cronrolled Release. *J. Appl. Polym. Sci.* , 96 (3), 808-813.
- Wang, Y., Nie, J., Chang, B., Sun, Y., & Yan, W. (2013). Poly(vinylcaprolactam)-Based Biodegradable Multiresponsive Microgels for Drug Delivery. *Biomacromolecules* , 14, 3034-3046.
- Webster, A., Halling, M., & Grant, D. (2007). Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. *Carbohydrate Research* , 342, 1189–1201.

- Yao, K., Li, J., Yao, F., & Yin (Editores), Y. (2012). *Chitosan-based Hydrogels. Functions and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Yua, C.-Y., Zhanga, X.-C., Zhoua, F.-Z., Zhanga, X.-Z., Chenga, S.-X., & Zhuo, R.-X. (2008). Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* , 357(1-2), 15-21.
- Zhang, T., Li, G., Guo, L., & Chen, H. (2012). Synthesis of thermo-sensitive CS-g-PNIPAM/CMC complex nanoparticles for controlled release of 5-FU. *International Journal of Biological Macromolecules* , 51, 1109–1115.
- Zhang, T., Li, G., Guo, L., & Chen, H. (2012). Synthesis of thermo-sensitive CS-g-PNIPAM/CMC complex nanoparticles for controlled release of 5-FU. *International Journal of Biological Macromolecules* , 51, 1109-1115.
- Zhi, J., Wang, Y., & Luo, G. (2005). Adsorption of diuretic furosemide onto chitosan nanoparticles prepared with a water-in-oil nanoemulsion system. *Reactive and Functional Polymers* , 65, 249-257.

# ANEXO I

Cálculo y ajuste de la curva de calibración de 5-FU en agua

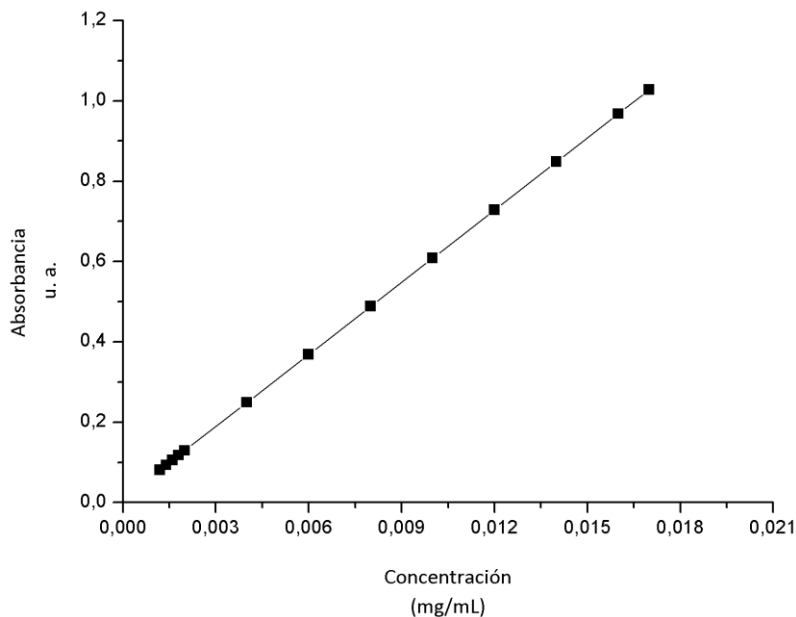


FIGURA 47. Curva de calibración del 5-FU en agua.

Tabla 5. Análisis estadístico de los datos para el ajuste de la curva de 5-fu en disolución agua.

	Concentración (mg / mL)	Absorbancia	CV	FR	$\overline{FR}$	%Recuperación		
	$X_i$	$Y_i$	$\overline{Y}_i$	$\frac{Y_i}{X_i}$	$X_{i-ajust}$	$\overline{X_{i-ajust}}$		
<b>Stock</b>	0.0180	0.9383	0.1930	52.1278	52.2352	0.0178	0.0178	99.0099
		0.9419		52.3278		0.0179		
		0.9405		52.2500		0.0178		
<b>1</b>	0.0162	0.8688	0.8845	53.6296	53.0926	0.0165	0.0163	100.5829
		0.8568		52.8889		0.0162		
		0.8601		52.7593		0.0162		
<b>2</b>	0.0144	0.7732	0.3067	53.6944	53.5995	0.0146	0.0146	101.4726
		0.7732		53.6944		0.0146		
		0.7691		53.4097		0.0146		
<b>3</b>	0.0126	0.6728	0.5510	53.3968	53.2275	0.0127	0.0127	100.6651
		0.6728		53.3968		0.0127		
		0.6664		52.8889		0.0126		

: ANEXO I

<b>4</b>	0.0108	0.5740	0.5699	1.2056	53.1481	52.7716	0.0108	0.0108	99.6649
		0.562			52.0370		0.0106		
		0.5738			53.1296		0.0108		
<b>5</b>	0.0090	0.4849	0.4793	1.3408	53.8778	53.2593	0.0091	0.0090	100.4106
		0.4723			52.4778		0.0089		
		0.4808			53.4222		0.0091		
<b>6</b>	0.0072	0.3924	0.3838	2.3381	54.5000	53.3102	0.0074	0.0072	100.2320
		0.3745			52.0139		0.0070		
		0.3846			53.4167		0.0072		
<b>7</b>	0.0054	0.2984	0.2916	2.1288	55.2593	54.0062	0.0056	0.0055	101.0993
		0.2862			53.0000		0.0054		
		0.2903			53.7593		0.0054		
<b>8</b>	0.0036	0.2018	0.1964	3.2981	56.0556	54.5463	0.0037	0.0036	101.2100
		0.1892			52.5556		0.0035		
		0.1981			55.0278		0.0037		
<b>9</b>	0.0018	0.0977	0.0976	4.82	54.2778	54.2037	0.0018	0.0018	97.8009
		0.0928			51.5556		0.0017		
		0.1022			56.7778		0.0018		

CV = Coeficiente de Variación; FR = Factor de Respuesta.

## ANEXO II

### Resultados del Método II

Para los sistemas obtenidos con este método se obtuvieron los siguientes tamaños de partícula con la técnica de DLS:

Tabla 6. Resultados del tamaño de partícula medido por DLS para el Método II.

Sistema	Tamaño (nm)	Desviación Estándar (nm)	% Másico
Emulsión CS	632.4	98.2	100
Emulsión GA	13.4	1.0	99.2
	70.9	14.3	0.8
<i>net-CS</i>	34.1	-	-
	161	-	-

De los resultados anteriores se puede deducir que al entrecruzar las partículas de CS, se reduce el tamaño de partícula considerablemente.

### Resultados del Método III

En este método se midió el tamaño de partícula después de haber precipitado las nanopartículas y posteriormente haberlas redispersado como se explica a continuación.

Una vez que los nanogeles fueron obtenidos, se redispersaron en agua y por separado en una disolución acuosa de AcOH 10 % v/v para ser analizadas por la técnica de DLS, por lo que primero se verificó por efecto Tyndall con un láser de He-Ne que la muestra estuviera redispersa en el disolvente (ver Figura 48). Con este análisis previo se decidió medir el tamaño de partícula en AcOH como medio, ya que aunque algunos agregados precipitaban, suficiente cantidad de muestra se encontraba dispersa. Los resultados se reportan la Tabla 7.

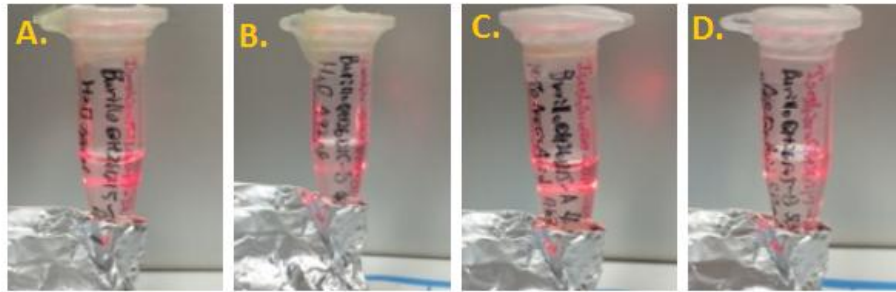


FIGURA 48. Efecto Tyndall de: a) *net-CS* dispersado en agua; b) (*net-CS*)-g-NVCL con 5% de injerto de NVCL dispersado en agua; c) *net-CS* dispersado en AcOH al 10 % v/v; d) (*net-CS*)-g-NVCL con 5% de injerto de NVCL dispersado en AcOH al 10% v/v.

Tabla 7. Resultados del tamaño de partícula medido por DLS para el Método III.

Sistema	Distribución de Tamaño de Partícula en Número
	Tamaño (nm)
<i>net-CS</i>	132
( <i>net-CS</i> )-g-NVCL	130

## Caracterización de las esferas de (*net-CS*)<sub>b</sub>

### Microscopía Óptica

Se sintetizaron esferas de hidrogles entrecruzados y se varió la concentración de CS manteniendo constante la cantidad de entrecruzante. La morfología de la superficie se pudo apreciar por medio de Microscopía óptica.

La Figura 49 muestra que la homogeneidad de la superficie es mayor para las esferas con menor concentración de CS, haciéndola mucho más rugosa para los hidrogles con 5% w/v de concentración de CS.

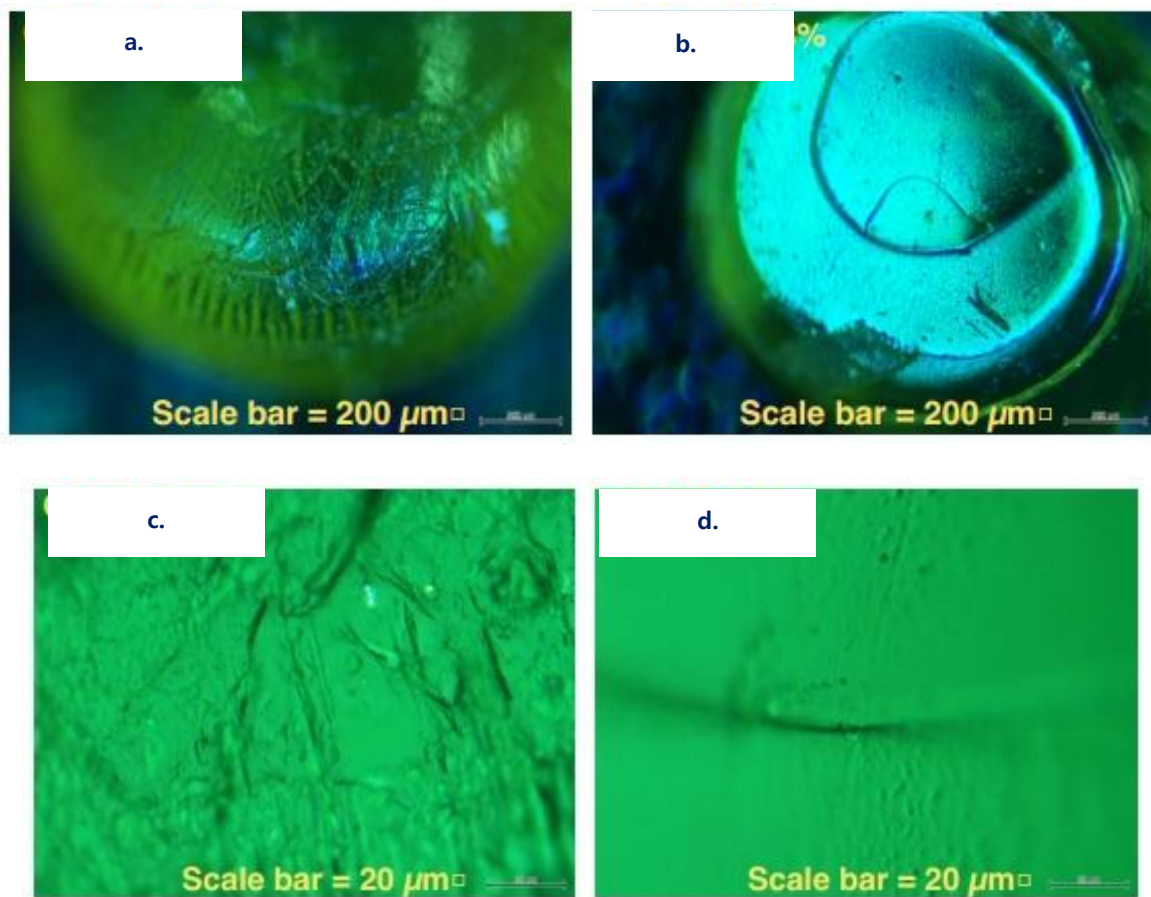


FIGURA 49. Imágenes del microscopio óptico de los macrogeles de CS. Las imágenes a. y b. corresponden a geles tomadas con una lente objetivo de 5X (5 y 3% w/v de CS respectivamente); mientras que c. y d. fueron tomadas con una lente objetivo de 50X (5 y 3% w/v de CS respectivamente).

### Microscopía Láser Confocal

Otra vista de los geles a escala macroscópica se obtuvo con esta técnica de microscopía, con la cual se pudo apreciar la superficie en 3D de los mismos. Con esta técnica se pudo confirmar que los geles con mayor concentración de CS poseen una mayor rugosidad y menor heterogeneidad de su superficie.



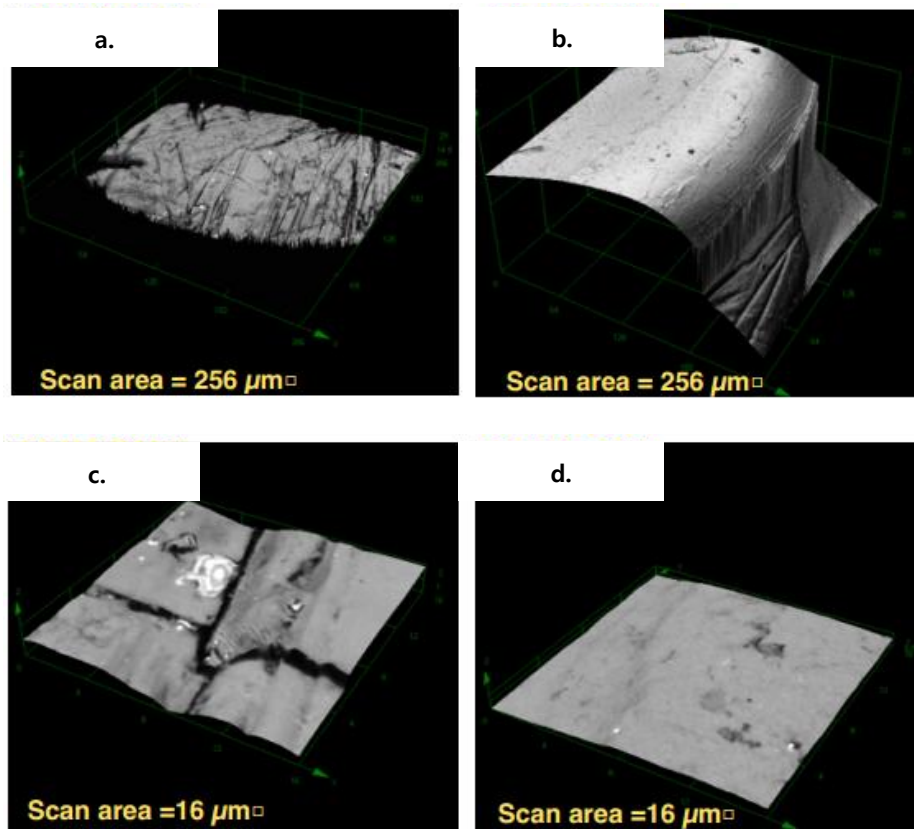


FIGURA 50. Imágenes de microscopía láser confocal tomadas a macrogeles de CS: a. y c. *net*-CS concentración de CS 5% w/v; b. y d- *net*-CS concentración de CS 3% w/v

### Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Fuerza Atómica

Las técnicas anteriores mostraban la topología de los geles a macroescala, en cambio, por SEM y AFM se muestran desde la perspectiva a nanoescala. Debido a que las pruebas fueron llevadas a cabo en el estado colapsado y no hinchado, no fue posible observar los poros o el tamaño de los mismos; sin embargo, se confirma que para geles con mayor concentración de CS, se tiene una superficie más heterogénea y rugosa, lo cual se presenta a escala macrométrica y nanométrica.

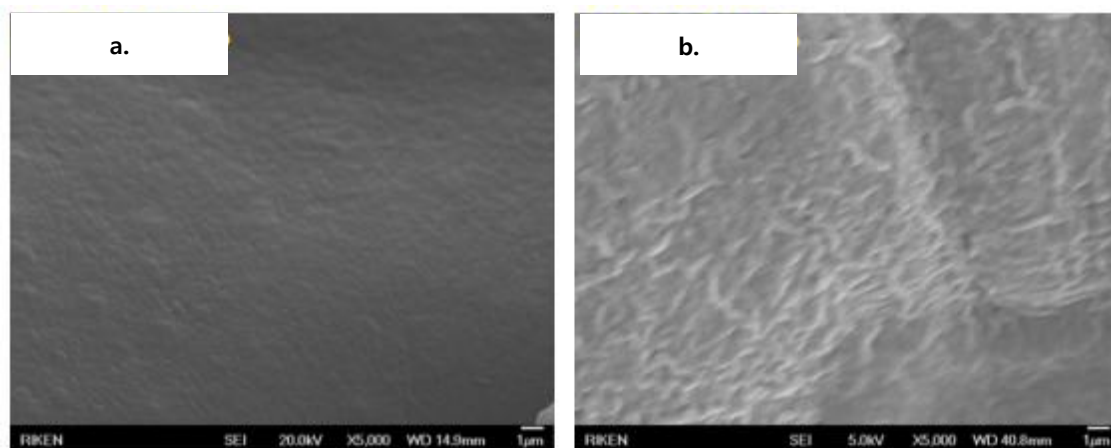


FIGURA 51. Imágenes de microscopía electrónica de barrido tomadas a macrogeles de CS. a. *net*-CS con concentración de CS 5% w/v; b. *net*-CS con concentración de CS 3%w/v.

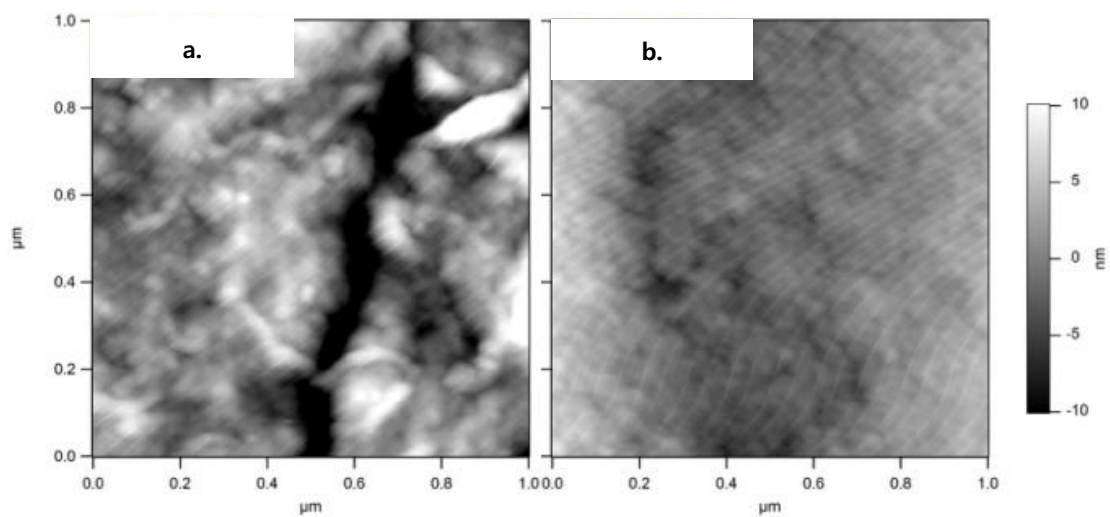


FIGURA 52. Imágenes de Microscopía Fuerza Atómica tomadas a macrogeles de CS. . a. *net*-CS con concentración de CS 5% w/v; b. *net*-CS con concentración de CS 3%w/v.