



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE  
FÁRMACOS BASADO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
M.C. EURYDICE CAROLINA ARROYO SAHAGÚN

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. AMELIA OLIVAS SARABIA  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
DR. DOMINGO MADRIGAL PERALTA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

ENSENADA, B.C. MÉXICO, OCTUBRE 2017



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.

Tesis avalada por el comité tutor:

COMITÉ TUTOR:

Dra. Amelia Olivas Sarabia  
Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo  
Miembro de comité Tutor

Dr. Domingo Madrigal Peralta  
Miembro de comité Tutor

FIRMA:

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto Tecnológico de Tijuana

JURADO:

Dr. Enrique Jaime Lima Muñoz  
Presidente

Dra. Amelia Olivas Sarabia  
Primer vocal y director de tesis

Dra. Mercedes Teresita Oropeza Guzmán  
Segundo vocal

Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Tercer vocal

Dr. Rubén César Villareal Sánchez  
Secretario

FIRMA:

Instituto de Investigación en Materiales

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Instituto Tecnológico de Tijuana

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Universidad Autónoma de Baja California

## DEDICATORIA

*A Dios*

Por haberme la paciencia y la fuerza para seguir avanzando en mis proyectos profesionales. Por la salud que me ha brindado para permitirme realizar mi investigación. Pero sobretodo ponerme a las personas indicadas en mí camino que me han ayudado a ser la persona que ahora soy y quitarme a aquellas que solo buscaban perjudicarme aunque en un principio no lo entendiera.

*A mis Padres Eduardo Arroyo y María Sahagún*

Por ser mí máximo apoyo desde que fui concebida hasta ahora, sin dejarme sola a pesar de que muchas veces que no lo agradecí o no lo merecía, por que estuvieron en cada paso, lágrima y esfuerzo durante toda mi vida. Gracias a su esfuerzo esta tesis les es dedicada.

*A mis Hermanos, Minea, Eduardo y Jessica*

Por ese gran soporte que han sido durante mi existencia, tanto en las buenas y principalmente en las malas, y sé que estarán para mí en cualquier momento. Por su ayuda en los diferentes estilos y especialidades con las que cuenta cada uno.

*Ustedes fueron, son y serán el Sentido de mi Vida*

"Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a él"

Louis Pasteur

## AGRADECIMIENTOS

He tenido la suerte de rodearme de grandes personas que han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis doctoral:

Agradezco el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología especialmente por mi beca. Al proyecto CONACyT número 174492 por el apoyo recibido para la realización de este trabajo de tesis. Y Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

A mi directora de tesis, Dra. Amelia Olivas Sarabia, por todas esas horas que hemos pasado juntas, por sus conocimientos para el análisis de todos los datos de esta tesis, por darme ánimos para seguir adelante. Agradezco al Dr. Luis Enríquez Paredes de la UABC por el apoyo brindado para el impulso de esta tesis, en cuanto a la experimentación bacteriana. Al Dr. Ricardo Valdez Castro por su ayuda, recomendaciones y sugerencias que hicieron posible mucho de los análisis experimentales. A los miembros de mi comité tutorial por su amable aceptación, por el tiempo y las recomendaciones vertidas en la investigación: Dr. José Manuel Cornejo Bravo y Dr. Domingo Madrigal Peralta.

A mis familiares y amigos, que me ayudaron a seguir adelante cuando flaqueé y mis dudas no me dejaban ver otras posibilidades, por las sugerencias de cómo podría resolver los problemas que me aquejaban en el laboratorio y sobre todo aquellos que dibujaron una sonrisa cuando estaba abatida y cansada. Al M. en I. Héctor López, por su apoyo y comprensión durante el desarrollo de la tesis. Para el I.B.Q. Ricardo Palafox Hernandez por su fundamental apoyo y para la M.C. Diana Kusters por sus consejos y ayuda técnica. Para esas personitas que no estuvieron conmigo físicamente pero que siempre me alentaron con bellas palabras *vía online*.

Mi gratitud a todos los técnicos y personas que laboran en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología – UNAM, por su apoyo y por hacerme pasajera mi estancia, al Dr. Eric Flores y Técnico Francisco Ruíz, por su asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo.

## RESUMEN

### “Desarrollo de un sistema de transporte y liberación de fármacos basado en nanopartículas poliméricas”

La nanotecnología basada en polímeros es un área muy importante para la farmacología, involucrando elementos como micelas poliméricas, complejos de polímero-ADN, nanogeles, entre otros. De estos ejemplos los que presentan un gran potencial son los copolímeros en bloques o poloxámeros comercialmente llamados Pluronic<sup>®</sup>. Las micelas, al encapsular los fármacos y actuar como acarreador, disminuyen la extravasación o derramamiento de los mismos en tejidos normales, lo que permite al principio activo llegar intacto a los tumores. Por lo que se busca mejorar las propiedades de permeabilidad y retención de los acarreadores.

En este trabajo se desarrollaron tres sistemas de liberación controlada de fármacos por medio de nanopartículas poliméricas de base Pluronic P123 (P1) y mezclas de P123 con polivinilpirrolidona (P2) y P2 con polietilenglicol (P3). Estas nanopartículas fueron cargadas con diferentes ingredientes activos farmacéuticos modelo tales como: Indometacina, L-metionina, Resveratrol, Coenzima Q10, 5-Fluorouracilo e Imiquimod. Se determinaron los perfiles de liberación de los fármacos *in vitro*, para su potencial aplicación en el tratamiento de carcinoma basocelular, y como antioxidantes para uso cutáneo.

Los nanopolímeros formulados en este estudio resultaron ser componentes biológicamente inertes, que protegen a los medicamentos de la degradación, prolongan la biodisponibilidad, lo que en consecuencia debería mejorar el transporte de los ingredientes activo-farmacéuticos. Las formulaciones micelares propuestas demostraron encapsulamiento y liberación sostenida a una concentración 10:1 de polímero a fármaco. Las micelas presentaron morfología esférica y tamaño nanométrico para las partículas sin carga del principio activo, y micrométrico para las partículas cargadas, de acuerdo a la caracterización por microscopia electrónica (de barrido y de transmisión). El tamaño de nanopartícula fue confirmado por DLS (dispersión de luz dinámica). Asimismo se obtuvieron los perfiles de liberación por el método de diálisis monitoreado por espectrofotometría UV-vis. Se registró para la muestra P1 una liberación moderada, para P2 liberación prolongada y para P3 una liberación rápida.

## ABSTRACT

“Development of a drug delivery and release system based on polymer nanoparticles”

Polymer-based nanotechnology is a very important area for pharmacology, involving elements such as polymer micelles, polymer-DNA complexes, and nanogels, among others. Of these examples, those having a great potential are the block copolymers or poloxamers commercially called Pluronic®. Micelles, by encapsulating the drugs and acting as a carrier, decrease the extravasation or leakage of the same in normal tissues, which allows the active principle to reach the tumors intact. Therefore, it is sought to improve the properties of permeability and retention of the carriers.

In this work, three controlled drug delivery systems were developed by using Pluronic® P123 (P1) polymer nanoparticles and mixtures of P123 with polyvinylpyrrolidone (P2) and P2 with polyethyleneglycol (P3). These nanoparticles were loaded with different drug model such as: Indomethacin, Resveratrol, Coenzyme Q10, 5-Fluorouracil and Imiquimod. The drug release profiles *in vitro* were determined for potential cutaneous application. The nanopolymers formulated in this study proved to be biologically inert components, which protect the drugs from degradation, prolong the bioavailability, which should consequently improve the transport of the active-pharmaceutical ingredients. The samples prepared demonstrated encapsulation and sustained release at a 10:1 concentration from polymer to drug. The samples presented spherical morphology and nanometric size for the unloaded particles, and micrometric for the drug-loaded particles according to the characterization by electron microscopy (scanning and transmission). The nanoparticle size was confirmed by DLS (dynamic light scattering). The release profiles were also obtained by the dialysis method monitored by UV-vis spectrophotometry. A moderate delivery was recorded for sample P1, for P2 prolonged release and for P3 a rapid release.

# ÍNDICE

	PÁGINA
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE.....	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
SIGLAS y ABREVIATURAS.....	XI
<b>CAPÍTULO I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. Antecedentes.....</b>	<b>4</b>
2.1 Estado del arte.....	4
2.1.1 Definición estructural y clasificación de los geles.....	4
2.1.2 Fármaco-liberación.....	7
2.1.3 Polímeros utilizados en sistemas de liberación de fármacos.....	8
2.1.4 Nanohidrogeles inteligentes.....	10
2.1.5 La piel y sus afecciones.....	13
2.1.5.1 Cáncer de piel tipo Carcinoma Basocelular.....	13
2.1.5.2 Nanotecnología en el tratamiento del cáncer.....	13
2.1.5.3 Envejecimiento de la piel.....	15
2.2 Planteamiento del Proyecto.....	18
2.2.1 Justificación.....	18
2.2.2 Objetivo general.....	19
2.2.3 Objetivos Específicos.....	19
2.2.4 Hipótesis.....	20
<b>CAPITULO III. Desarrollo Experimental.....</b>	<b>21</b>
3.1 Materiales y reactivos.....	21
3.1.1 Polímeros.....	21
3.1.2 Fármacos de uso cutáneo.....	23
3.1.3 Cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.1.4 Medios de cultivo y soluciones.....	27
3.2 Métodos de preparación.....	28
3.2.1 Preparación de materiales nanopoliméricos.....	28
3.2.2 Curvas de calibración de fármacos.....	29
3.2.3 Métodos de cargado para los nanosistemas poliméricos.....	30
3.2.4 Método de carga y mecanismo de fármaco-liberación.....	31
3.2.5 Bioensayos con <i>E. coli</i> .....	31
3.3 Caracterización de los sistemas nanopoliméricos.....	32
3.3.1 Preparación de muestras para HRTEM.....	32
3.3.2 Preparación de muestras para SEM.....	33
3.3.3 Dispersión de luz dinámica y potencial Zeta.....	33

3.3.4 Retrodispersión de luz por TurbiscanLab® .....	34
<b>CAPÍTULO IV. Resultados y Discusiones .....</b>	<b>35</b>
4.1 Formulaciones de sistemas poliméricos .....	35
4.2 Morfología por HRTEM .....	36
4.2.1 Sistemas poliméricos libre de fármacos .....	37
4.2.2 Polímeros cargados con Indometacina .....	38
4.2.3 Polímeros cargados con 5-FU .....	39
4.2.4 Polímeros cargados con Imiquimod .....	40
4.3 Morfología por SEM .....	42
4.3.1 Polímeros cargados con Resveratrol y Q10 .....	42
4.4 Curvas de calibración .....	43
4.5 Métodos de cargado de nanopolímeros .....	45
4.6 Perfiles de fármaco-liberación .....	46
4.6.1 Antiinflamatorio Indometacina .....	46
4.6.2 Antioxidantes. CoQ10, Resveratrol y L-metionina. ....	48
4.6.3 Fármacos para el tratamiento de CBC. Imiquimod y 5-FU .....	51
4.7 Estudio por DLS y Potencial Zeta .....	53
4.8 Bioensayos en <i>E. coli</i> .....	56
4.8.1 Nanosistemas poliméricos sin carga de fármaco .....	56
4.8.2 Sistemas poliméricos cargados de fármaco .....	57
4.8.2.1 CoQ10 y Resveratrol .....	57
4.8.2.2 Imiquimod y 5-FU .....	59
4.9 Estabilidad de suspensiones .....	62
<b>CAPÍTULO V. Conclusiones .....</b>	<b>68</b>
ANEXOS .....	71
A.1 Estudio FT-IR para los sistemas poliméricos cargados con Indometacina .....	71
A.2 Primera aproximación en modelo matemático para los sistemas poliméricos ...	73
LITERATURA CITADA .....	75

## LISTA DE TABLAS

TABLAS	PÁGINAS
Tabla 1. Características de diferentes tipos de liberación controlada.....	7
Tabla 2. Polímeros más representativos en la liberación controlada de fármacos.....	9
Tabla 3. Ejemplos de valores de pH en el organismo humano.....	12
Tabla 4. Composición del agar LB.....	27
Tabla 5. Composición del caldo LB.....	28
Tabla 6. Composición de la solución tampón PBS.....	28
Tabla 7. Longitud de onda, rango de dilución y coeficiente de extinción de fármacos...	29
Tabla 8. Tamaños y potencial zeta para las muestras con y sin carga de fármaco.....	55

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 1. Esquema de comparación entre tratamientos de dosificación.....	2
Figura 2. Clasificación estructural básica de los geles.....	6
Figura 3. Esquema de la respuesta de hinchamiento ante la presencia de un estímulo.....	11
Figura 4. Mecanismo esquemático de liberación del fármaco en los nanogeles.....	12
Figura 5. Esquema de la estructura interna de un nanosistema funcionalizado.....	14
Figura 6. Esquemas de tipos de vehiculización de los sistemas a la diana de acción.....	15
Figura 7. Fotografía del HRTEM.....	32
Figura 8. Fotografía del SEM.....	33
Figura 9. Fotografía del DLS.....	34
Figura 10. Fotografía del TurbiscanLab®.....	34
Figura 11. Fotografía de los sistemas poliméricos preparados.....	35
Figura 12. Esquema de los sistemas poliméricos.....	36
Figura 13. Micrografías de HRTEM de los sistemas poliméricos.....	37
Figura 14. Micrografías de HRTEM de los sistemas cargados con Indometacina.....	38
Figura 15. Micrografías de HRTEM de los sistemas cargados con 5-FU.....	40
Figura 16. Micrografías de HRTEM de los sistemas cargados con imiquimod.....	41
Figura 17. Micrografías SEM de los sistemas cargados con antioxidantes.....	42
Figura 18. Curvas de calibración para los fármacos.....	45
Figura 19. Efecto del método de cargado en los sistemas en la fármaco-liberación.....	46
Figura 20. Perfiles de liberación de los sistemas cargados con Indometacina.....	47
Figura 21. Perfiles de liberación de los sistemas cargados con antioxidantes.....	50
Figura 22. Perfiles de liberación de los sistemas cargados con 5-FU e Imiquimod.....	52
Figura 23. Perfiles de distribución de tamaño para los sistemas poliméricos.....	54
Figura 24. Bioensayos de formulaciones preparadas libre de fármaco.....	57
Figura 25. Bioensayo con sistemas cargados con antioxidantes.....	59
Figura 26. Bioensayo con sistemas cargados con 5-FU e Imiquimod.....	60
Figura 27. Perfiles de transmisión para los sistemas poliméricos.....	64
Figura 28. Perfiles de transmisión para sistemas cargados con Resveratrol.....	65
Figura 29. Perfiles de transmisión para sistemas cargados con 5-FU.....	66
Figura 30. Perfiles de transmisión para sistemas cargados con Imiquimod.....	67
Figura A1. Espectro de FTIR de Indometacina.....	71
Figura A2. Representación del sistema aplicado para estudiar la fármaco-liberación.....	73

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
L	Longitud	mm
M	Molaridad	$\frac{\text{mol}}{\text{L}}$
T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
t	Tiempo	h
V	Volumen	mL
$\epsilon$	Coefficiente de extinción	$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
a. C.	Antes de Cristo
$\text{cm}^3$	Centímetros cúbicos
conc	Concentrado
d. C.	Después de Cristo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
g	Gramos
K	Kelvin
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitro
mg	Miligramos
mL	Mililitro
% P/V	Por ciento peso/volumen
% T	Por ciento de Transmitancia
U.A.	Unidades Arbitrarias

Abreviatura	Término
5-FU	5-fluorouracilo
CBC	Carcinoma Basocelular
CoQ10	Coenzima Q10
D1	P1 cargado con Imiquimod
D2	P2 cargado con Imiquimod
D3	P3 cargado con Imiquimod
F1	P1 cargado con 5-fluorouracilo
F2	P2 cargado con 5-fluorouracilo
F3	P3 cargado con 5-fluorouracilo
I1	P1 cargado con Indometacina

I2	P2 cargado con Indometacina
I3	P3 cargado con Indometacina
M1	P1 cargado con L-Metionina
M2	P2 cargado con L-Metionina
M3	P3 cargado con L-Metionina
P123	Pluronic P123
P1	Polímero 1 (P123)
P2	Polímero 2 (P123+PVP)
P3	Polímero 3 (P123+PVP+PEG)
PEG	Poli(etilenglicol)
PEO	Óxido de Polietileno
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PPO	Óxido de Polipropileno
PVP	Polivinilpirrolidona
Q10	Coenzima Q10
Q1	P1 cargado con Coenzima Q10
Q2	P2 cargado con Coenzima Q10
Q3	P3 cargado con Coenzima Q10
R1	P1 cargado con Resveratrol
R2	P2 cargado con Resveratrol
R3	P3 cargado con Resveratrol

## Siglas en el idioma inglés

Sigla	Término
DLS	Dynamic Light Scattering
EPR	Enhance Permeation Retention
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared spectroscopy
HRTEM	High Resolution Transmission Electron Microscopy
OD	Optical Density
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potential of hydrogen
ROS	Reactive Oxygen Species
SEM	Scanning Electron Microscopy
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B
UV-vis	Ultraviolet-Visible

## CAPÍTULO I. Introducción

En la actualidad, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En el año 2012 hubo alrededor de 14 millones nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer y las predicciones son que el número de casos irá en ascenso con el paso de los años. El término genérico tomado por la OMS para el cáncer lo explica como un grupo extenso de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Una de sus características es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes contiguas del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis [1]. La alimentación, la inactividad física y algunas sustancias nocivas tales como el tabaco y alcohol promueven su desarrollo. Incluso con los adelantos en investigación aún se desconoce gran parte de las diferencias existentes entre una célula normal y una cancerosa, lo que imposibilita el control y la eliminación de la enfermedad en la mayoría de los casos [2].

Entre los distintos tipos de cáncer que se pueden encontrar, el cutáneo es uno de los más susceptibles a desarrollarse debido a que es multifactorial aunado a que la piel es el órgano más grande del cuerpo humano, siendo la radiación ultravioleta (UV) de los rayos solares el principal agente etiológico<sup>1</sup>. El daño en las células epiteliales inicia con la alteración del ácido desoxirribonucleico (ADN) debido a los rayos UV, seguido de fallas en el sistema de reparación del mismo, lo que representa la causa primaria de la aparición de éstas neoplasias<sup>2</sup> [3, 4].

La mayoría de principios activos para los tratamientos de enfermedades presentan un alto peso molecular y por ende, una baja solubilidad acuosa sin ser la excepción los medicamentos para el cáncer. La hidrofobicidad de dichas sustancias presenta dos retos: a) por su corta vida en la sangre, se requiere continuas dosis del fármaco y b) la continua administración del mismo conlleva efectos secundarios debidos a la baja especificidad, dañando tejidos y células sanas [2].

La administración de fármacos en forma local en lugar de sistémicamente (afectando a todo el cuerpo) es una manera frecuente de disminuir los efectos secundarios

---

<sup>1</sup>Rama de la medicina que se encarga del estudio del origen o las causas de las enfermedades.

<sup>2</sup>Término utilizado en medicina para nombrar una masa anormal de tejido resultado de una alteración en la proliferación o diferenciación celular.

y la toxicidad del principio activo, a la vez que se maximiza el impacto del tratamiento. Además, podría superarse, o al menos reducirse, la resistencia a fármacos que impide la eficacia de agentes quimioterapéuticos convencionales. Mientras más dirigido sea un fármaco, menor es su probabilidad de desarrollar resistencia a los ingredientes activos farmacéuticos. En la Figura 1 se esquematizan los altibajos de una dosificación tradicional de fármacos *versus* un tratamiento de dosificación controlada. De aquí parte la importancia de resolver las limitaciones de los sistemas convencionales de administración y mejorar los métodos de administración actuales o bien, el diseño de nuevos métodos que puedan incrementar la efectividad en el uso de los medicamentos existentes, así como también la biodistribución de los mismos usando nanopartículas que lleven a cabo una liberación controlada[5].

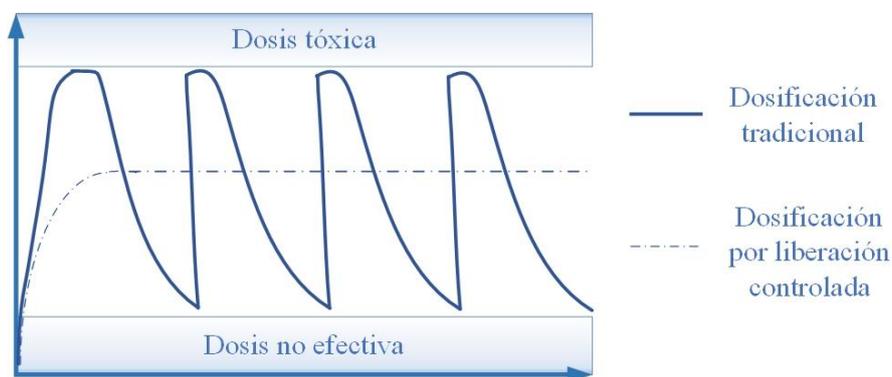


Figura 1. Esquema de comparación entre un tratamiento de dosificación tradicional con un tratamiento de dosificación controlada [2].

Las nanopartículas para la administración de ingredientes activos farmacéuticos son capaces de controlar el ritmo de liberación del fármaco y/o sitio donde se liberarán en el cuerpo, en función de un parámetro externo a ellas. De acuerdo al mecanismo en que se lleva el principio activo cargado al sitio de interés, se clasifican en dos tipos principalmente, mecanismo de direccionamiento pasivo y activo. El mecanismo de direccionamiento pasivo consiste en llevar el principio activo a las células diana<sup>3</sup> mediante el uso selectivo de la fisiopatología única de los tumores, tales como su permeabilidad mejorada y efecto de retención y el microambiente del tumor. Además de este, el mecanismo de direccionamiento activo usa ligandos o anticuerpos dirigidos hacia las células dianas incrementando aún más la especificidad de las nanopartículas

<sup>3</sup>La célula diana o blanco o target (blanco de tiro en inglés) son células receptoras o células efectoras, estas células poseen receptores específicos para las hormonas en su superficie o en el interior.

terapéuticas [5]. Estos avances en nanotecnología incorporados al cuidado y tratamiento de la salud dan como resultado otra rama de la ciencia denominada nanomedicina. La nanomedicina entre otras tareas, busca implementar el uso de micro y nanopolímeros en sistemas de transporte con alta especificidad y actividad, sin presentar efectos tóxicos, que permita una liberación controlada y además consienta reducir la dosificación del fármaco [6]. En nanomedicina, existen más de 247 productos aprobados o en estadios clínicos previos a su comercialización. Muchos de los cuales presentan una gran variedad de aplicaciones por mencionar algunas, regeneración tisular, implantes dentales, tratamiento de tumores e hipertermia. Específicamente para los hidrogeles, se intuye un repunte eminente de su uso, pues hoy en día sólo aparece un producto comercializado con estas características tan prometedoras de acuerdo a la literatura [2].

En este trabajo de tesis, se desarrollaron sistemas nanopoliméricos solubles en agua y biocompatibles, capaces de encapsular ingredientes activos farmacéuticos. Los sistemas poliméricos se desarrollaron a partir de micelas base Pluronic P123 con mezclas de polímeros PVP/PEG. Se utilizó Indometacina como principio activo modelo debido a su estabilidad para luego usar otros principios activos usados para el tratamiento de carcinoma basocelular, y de tipo antioxidantes para su potencial uso cutáneo. Las formulaciones desarrolladas fueron caracterizadas fisicoquímicamente así como también se estudió su morfología y el correspondiente proceso de liberación *in vitro*. Puede deducirse que se mejoró la solubilidad de los fármacos indirectamente puesto que al momento de ser cargados en las nanopartículas poliméricas todo el sistema nanopartícula-fármaco respondió al estímulo de la temperatura que normalmente tiene la piel.

## CAPÍTULO II. Antecedentes

### 2.1 Estado del arte

#### 2.1.1 Definición estructural y clasificación de los geles

La palabra *gel* se utiliza con frecuencia, no sólo en las ciencias naturales, sino también en la vida cotidiana. Muchos de los productos industriales o sus ingredientes, especialmente en el mercado de alimentos y cosméticos, están etiquetados con el término *gel*. Una definición estructural rápida define a los geles como un material auto soportado, en el que se combinan dos componentes diferentes, uno de los cuales es líquido y el otro sólido [7]. Más específicamente un *gel* es un sistema que consiste de moléculas, partículas, cadenas, etc., que están parcialmente conectados entre sí en un medio fluido por entrecruzamientos en dimensiones macro y microscópicas [8]. Cabe mencionar, que los enlaces cruzados pueden ser reales (por ejemplo, en redes covalentes) o aparentes (por ejemplo, en soluciones micelares saturadas) [9-11]. El término "nanogeles" suele definir dispersiones acuosas de partículas de hidrogel formadas por redes de polímero física o químicamente reticulados de tamaño nanométrico [12].

Los métodos utilizados para la preparación de nanogeles se pueden dividir en cuatro; a) autoensamblaje físico de polímeros interactivos; b) polimerización de monómeros en fase homogénea o en medio ambiente micro o nano-heterogéneo; c) la reticulación química de preformado polimérico y d) la nanofabricación asistida por plantilla. El autoensamblaje físico de polímeros fue utilizado por varios grupos para producir varios nanogeles. Este método por lo general implica la agregación controlada de polímeros hidrófilos capaces de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas y/o enlaces de hidrógeno entre sí. La clasificación estructural de los geles se lleva a cabo considerando varios criterios, como la naturaleza de las uniones de la red, el orden estructural y homogeneidad.

Flory define cuatro diferentes clases de gel [13]:

- a) Redes poliméricas covalentes; completamente desordenada.
- b) Redes de polímeros formados a través de la agregación física; predominantemente desordenada, pero con regiones de orden local.
- c) Estructuras laminares bien ordenadas, incluyendo geles mesofásicos<sup>4</sup>.
- d) Partículas, estructuras desordenadas.

---

<sup>4</sup>Sustancias líquidas con una estructura interna cristalina en un rango constante de temperatura.

Una representación esquemática de las clases de geles se proporciona en la Figura 2. La primera clase está constituida por geles compuestos de redes reticuladas químicamente (covalentes), como ejemplo son las redes basadas en polisiloxano, los geles de poliestireno o de caucho vulcanizado. Estas redes covalentes exhiben uniones puntuales de la red sin extensión en el espacio y una funcionalidad baja. El gel es homogéneo y no hay orden estructural evidente. Además, una red covalente puede ser considerada como una sola molécula de tamaño infinito. Sin embargo, una red puede consistir también de muchas moléculas que interactúan a través de la agregación supramolecular o agregación física, que corresponde a la clase 2. Las uniones de la red en tal caso no son puntuales y tienen una funcionalidad bastante alta debido a la agregación parcial de las cadenas a través de cristalización o interacciones hidrófobas. La red puede ser considerada como una microfase separada. Dependiendo de la condición particular de las reticulaciones físicas (cristalina o amorfa), el gel es parcialmente ordenado o, análogo a las redes covalentes, completamente desordenado. Las redes de este tipo son por copolímeros tribloque de tipo ABA, donde sólo el bloque B es soluble en el componente líquido, como casi todos los elastómeros termoplásticos [14] y algunas redes poliméricas que son proteínas como la queratina [15] o el colágeno [16]. Estos presentan uniones de red formados por pequeños dominios cristalinos. En algunos casos, las redes físicas se pueden transformar posteriormente en redes covalentes, si las secuencias de la cadena son agregados reticulados químicamente después de la formación de la red. El gel consistiría en una red microfásica separada enlazada covalentemente.

Las primeras dos clases de gel descritas hasta ahora incluyen estructuras que se pueden considerar como redes reales. Los geles, sin embargo, también pueden estar compuestos de estructuras altamente ordenadas, forman pseudo-redes debido a las fuerzas atractivas como los puentes de hidrógeno, van-der-Waals o fuerzas electrostáticas. Estos sistemas se clasifican como clase 3 y se refiere a ellos a menudo como "líquidos estructurados" y consisten en estructuras laminares formadas por una variedad de surfactantes [17], fosfolípidos [18] y arcillas como la montmorillonita [19], y de otros agregados micelares regularmente empacados. El gel más común a base de polímero de este tipo está formado por tribloques copoliméricos Pluronic<sup>®</sup> de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(óxido de propileno)-bloque-poli(óxido de etileno) [20].

Cabe mencionar, que las aparentes uniones de las redes físicas (clase 2) y estructuras altamente ordenadas (clase 3) son a menudo mucho más débiles y mucho más dinámicas que en el caso de las redes covalentes. Por lo tanto, la resistencia del gel parece

ser algo más baja en la mayoría de los casos y la deformación mecánica se produce en escala de tiempo más corto y relativamente débil. La Figura 2 muestra una clasificación esquemática en base a la estructura de los geles de acuerdo a la literatura [21].

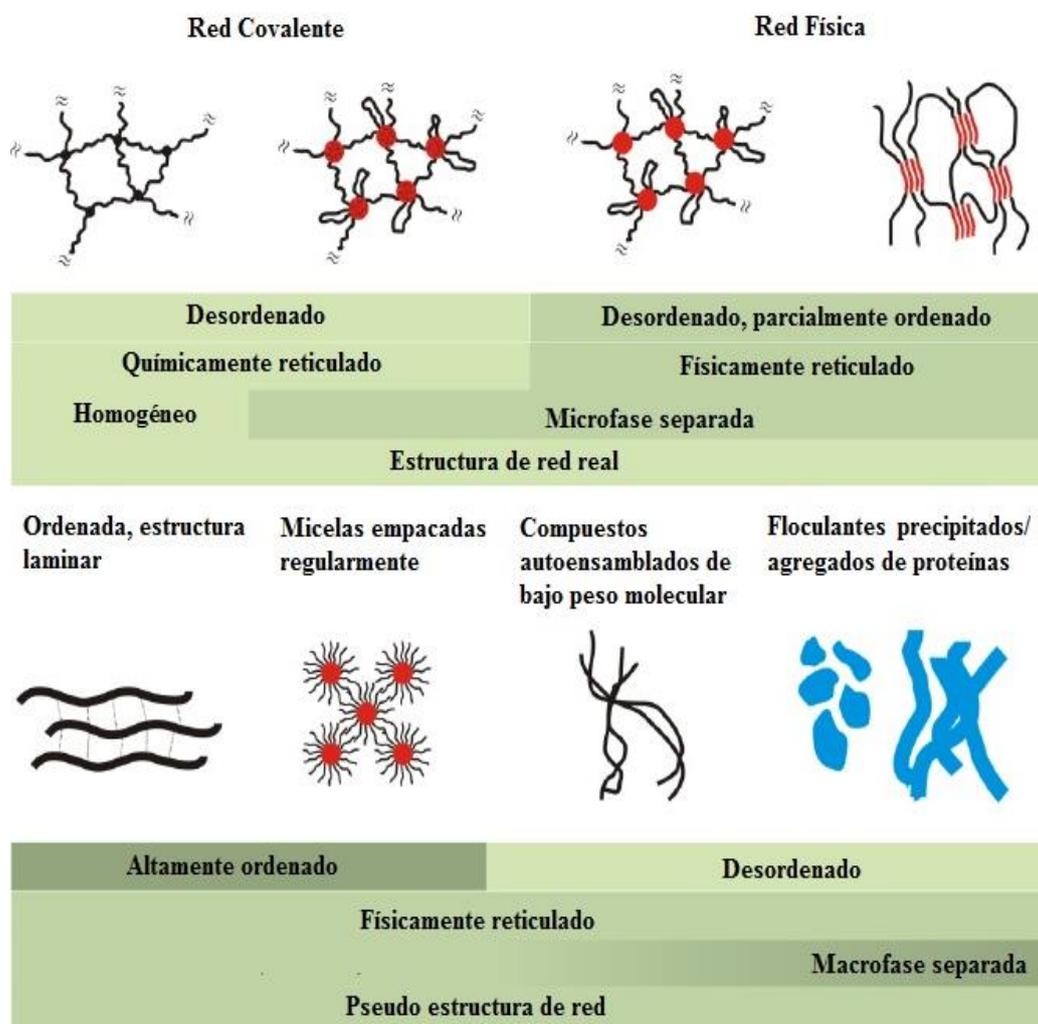


Figura 2. Clasificación estructural básica de los geles de acuerdo con el grado de orden, tipo de entrecruzamientos, la homogeneidad y el tipo de red [21].

Los geles tipo clase 4 implica a sistemas macrofásicos separados. Estos sistemas incluyen generalmente partículas con gran anisotropía geométrica, como agujas, fibrillas o redes de fibras, como los geles de  $V_2O_5$  [22] y globulares o agregados fibrilares de proteínas [23]. Los agregados fibrilares formados por ciertos compuestos de bajo peso molecular a través de autoensamblaje supramolecular en su mayoría presentan diámetros de fibrilla situados en la escala submicrométrica [24] por lo tanto, es razonable considerar estos sistemas como microfásicos en lugar de macrofásicos separados. Se observa que las redes también pueden ser covalentes de macrofase separadas (estructura de la red no homogénea) [25]. Estos sistemas forman una clase intermedia entre 1 y 4.

Los hidrogeles tienen la ventaja de que pueden cargarse fácilmente con moléculas hidrófobas y mantener su potencial para la administración de fármacos, además de que algunos polímeros hidrófilos de libre asociación permiten la encapsulación de biomacromoléculas [9, 26]. Por otro lado, es muy conocido que por regla general, la relación de hinchamiento disminuye a medida que el número de enlaces cruzados aumenta en los hidrogeles reticulados.

### 2.1.2 Fármaco-liberación

En los últimos años los avances tecnológicos se han dirigido en gran medida hacia el área médica, causando gran interés en la industria farmacéutica, surgiendo nuevos métodos, técnicas y materiales para la entrega, transporte y liberación de fármacos por medio de sistemas que permiten llevar a cabo estos procesos de una manera más controlada y conducente a objetivos específicos, ofreciendo algunas ventajas sobre los sistemas tradicionales tales como; modular la solubilidad en agua de ingredientes activos farmacéuticos, modificar la farmacocinética de principios activos, así como aumentar la vida media de sustancias activas dentro de un organismo, como también la mejora de pautas posológicas y el transporte de varios fármacos paralelamente [2, 27, 28]. En la Tabla 1 se presentan los principales tipos de liberación controlada.

Tabla 1. Características de diferentes tipos de liberación controlada[27].

Tipo de liberación	Características principales	Ejemplos
<b>Prolongada o controlada</b>	Diseñadas para garantizar una liberación más lenta del fármaco.	Comprimidos o parches lipídicos, hidrofilicos o de polímeros insolubles.
<b>Retardada</b>	Retrasan la liberación del principio activo. No prolongan el efecto terapéutico.	Sistemas de cubierta entérica o formas farmacéuticas gastroresistentes.
<b>Pulsátil</b>	Modificadas para garantizar una liberación secuencial del principio activo. Normalmente presentan dos fases: una inmediata y otra al cabo de un tiempo.	Sistemas que pretenden hacer coincidir la liberación del fármaco con ciclos circadianos hormonales.
<b>De control espacial</b>	Liberan el principio activo cuando la forma farmacéutica alcanza su lugar de acción.	Sistemas bioadhesivos, profármacos[29] y eritrocitos modificados[30].

Principales ventajas que presentan los sistemas de liberación controlada son [2, 27, 31, 32]:

- Administración de sustancias bioactivas de una forma lenta y constante evitando terapias por períodos prolongados.
- Aumenta la biodisponibilidad del principio activo.
- Minimizan efectos secundarios indeseables.
- Se logra una administración local de la droga.
- Reducción de dosis diarias.
- Aumenta la eficacia del principio activo
- Evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución

Principales desventajas de los sistemas de liberación controlada son [2, 27, 31, 33, 34]:

- La terapia no puede interrumpirse de inmediato
- No permite cambios de dosificación rápidos si hay efectos adversos
- Reacciones adversas locales en la zona de administración.
- No es fácil ajustar desviaciones debidas a pacientes particulares
- Riesgo de acumulación del fármaco y necesidad de ajuste de pautas posológicas.
- No todos los medicamentos son candidatos
- Equipos y procesos más costosos
- Correlaciones *in vitro/in vivo* difíciles de predecir.

Otra forma de clasificar los sistemas de liberación controlada es por el tipo de proceso en que se libera el fármaco. La liberación puede ocurrir por; *difusión, disolución, presión osmótica, fuerza mecánica, hinchamiento, erosión o activación* [2, 6, 27, 35].

### 2.1.3 Polímeros utilizados en sistemas de liberación de fármacos

Los biopolímeros son macromoléculas, que pueden ser obtenidas a partir de fuentes orgánicas como plantas, microorganismos y animales, o bien se pueden sintetizar de derivados del petróleo, creando así componentes biodegradables. El proceso de degradación está dado por acción de microorganismos como hongos o bacterias, generando CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O y pequeñas cantidades de compuestos inorgánicos. Todos los compuestos usados para el desarrollo de sistemas de liberación controlada, como sus productos, deben ser biodegradables y biocompatibles [36, 37].

Actualmente, en la elaboración de sistemas de liberación controlada, se utilizan un gran número de polímeros. Existen dos grandes grupos de polímeros, como es bien sabido, naturales y sintéticos, en la Tabla 2 se muestran ejemplos de los dos tipos de acuerdo a la literatura:

Tabla 2. Polímeros más representativos en la liberación controlada de fármacos [27, 38-41].

Polímeros	<b>Naturales</b>		Colágeno	
			Alginatos	
			Albúmina	
			Quitosano	
			Quitina	
	<b>Sintéticos</b>	Biodegradables		Ácido Poliláctico
				Ácido Poliglicólico
			Polietilenglicol	
			Polivinilpirrolidona	
			Polaxómeros	
	No Biodegradables		Ácido Poliacrílicos	
		Polimetilmetaacrilato		

El mecanismo que produce la liberación de principios activos de las matrices de los sistemas transportadores hacia el medio es un proceso importante que regula la velocidad de liberación del principio activo. Se inicia con la entrada del medio acuoso en la matriz provocando el hinchamiento de la misma, para continuar con la disolución del fármaco y su difusión a través de la matriz, y termina con la erosión del polímero. Para polímeros biodegradables, el principio activo puede liberarse por metabolización o erosión de la matriz en la que está encapsulado [37, 42], siendo la *difusión* en estos polímeros su principal controlador de velocidad [43].

Otros factores a considerar son:

- a) Características del fármaco como son peso molecular, solubilidad, tamaño, etc.
- b) Tipo de solvente y/o la presencia de diluyentes u otros excipientes [44].

En algunos casos, el principio activo atrapado en la capa superficial de los sistemas poliméricos se disuelve instantáneamente al entrar en contacto con el medio. A este fenómeno se le nombra en inglés como *efecto burst* (liberación rápida o explosiva). Esta cantidad liberada o *efecto burst* puede ser deseable mientras no supere el 20% de la cantidad total del ingrediente activo farmacéutico encapsulado, lo cual puede evitarse utilizando agentes entrecruzantes o lavando las partículas con solventes adecuados, que finalmente provoca una baja eficiencia de encapsulación [27, 45].

#### 2.1.4 Nanohidrogeles inteligentes

Los hidrogeles fueron los primeros biomateriales desarrollados para uso humano. Están siendo introducidos en varias líneas de investigación biológica y en la práctica clínica indicando su gran potencial especialmente en aplicaciones como la fármaco-liberación. El desarrollo de nanopartículas para la liberación controlada de ingredientes activos farmacéuticos ha mejorado los métodos terapéuticos en los últimos años. Entre las nanopartículas estudiadas y aplicadas en la actualidad, los nanogeles (hidrogeles de tamaño nanométrico) son una alternativa prometedora como sistemas de administración de ingredientes activos farmacéuticos debido a su gran estabilidad en la circulación prolongada en el torrente sanguíneo y la facilidad de encapsular fármacos [46, 47].

Los nanogeles con aplicación médica contienen redes de polímeros reticulados física o químicamente que permiten el hinchamiento del sistema en medio acuoso o fluido fisiológico, con la principal característica de ser biocompatibles, es decir, no producen daño a la célula [2]. Recientemente, se ha invertido un esfuerzo considerable en el desarrollo de nanogeles multicomponentes (de composición de diferentes polímeros) sensibles a los estímulos. Aquellos nanogeles que son capaces de responder a estímulos externos como pH, temperatura, ultrasonido, estímulos eléctricos, fotoirradiación, o campo magnético, son llamados nanogeles inteligentes. Cuyas respuestas se ven reflejadas por cambios en sus propiedades físico-químicas, tales como contenido de agua (expansión/colapso), volumen, índice refractivo, permeabilidad de la red interior e hidrofilia-hidrofobia [2, 47]. En la Figura 3 se presenta un esquema de la respuesta de hinchamiento o expansión de los nanogeles ante la presencia de un estímulo.

La temperatura, en casos seleccionados, puede afectar a la calidad del disolvente, y por lo tanto, el tamaño de partícula del nanogel. Por ejemplo, los nanogeles basados en Pluronic® son sensibles a la temperatura. Una rápida disminución de la temperatura hace

que estos presenten tamaños de 120 nm hasta hincharse drásticamente a más de 400 nm con un aumento de la temperatura [48]. Una de las ventajas de los hidrogeles altamente dispersos es que normalmente responden muy rápidamente a las condiciones ambientales cambiantes, lo que facilita la incorporación y la liberación de agentes biológicos en aplicaciones farmacéuticas.

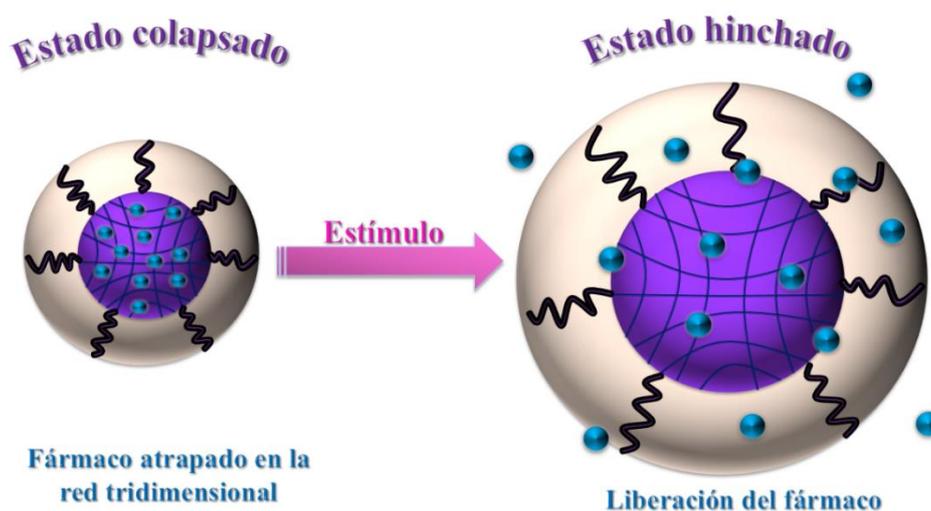


Figura 3. Esquema de la respuesta de hinchamiento ante la presencia de un estímulo [2, 49].

Los hidrogeles sin carga de fármaco, en un estado hinchado, contienen una considerable cantidad de agua. La carga de agentes biológicos se consigue normalmente de forma espontánea a través de fuerzas electrostáticas, van der Waals y/o interacciones hidrófobas entre el agente y la matriz polimérica. Como resultado, los hidrogeles se colapsan formando partículas estables, en el que un agente biológico queda atrapado. Es común que los hidrogeles presenten agregación, esta agregación se puede prevenir mediante la introducción en su estructura de polímeros de dispersión hidrófilos, como el polietilenglicol (PEG). Durante el colapso del complejo fármaco-hidrogel los polímeros hidrófilos se exponen a la superficie y forman una capa hidrófila protectora alrededor del hidrogel que previene la separación de fases. Lo que hace que los hidrogeles demuestren un excelente potencial para la administración de ingredientes activos farmacéuticos sistémicos ya que mejoran la biodisponibilidad<sup>5</sup> [26].

En el caso concreto del cáncer, se ha comprobado que las células cancerosas presentan un pH más ácido (pH 6.5) que el que revelan los tejidos y células normales

<sup>5</sup>La biodisponibilidad es el porcentaje de una dosis administrada de fármaco que llega al flujo sanguíneo inalterada.

circundantes (pH 7.4) [50]. En la Tabla 3 se pueden observar los diferentes pH del cuerpo humano. Esta variabilidad de pH es interesante desde el punto de vista farmacéutico porque permite liberar el principio activo contenido en el nanohidrogel exclusivamente en el lugar de interés. De aquí parte la importancia de diseñar nanohidrogeles capaces de hincharse y liberar el fármaco al pH ácido imperante en el entorno del tumor (Figura 4).

Tabla 3. Ejemplos de valores de pH en el organismo humano [51].

	pH
Duodeno	5
Estómago	1-3
Yeyuno	6
Íleon	6.6-7.5
Células tumorales	6.5
Tejido sano	7.4
Lisosoma	4.5-5

En los nanohidrogeles, la superficie puede contener dos grupos funcionales o más, aunque más de dos podría disminuir su efectividad, que logren mejorar la entrega específica en el sitio de interés, por ejemplo, los aniones folato. Estos nanogeles modificados tipo folato mostraron un aumento notable del transporte a través de una barrera modelo gastrointestinal *in vitro*. En otro estudio, los microgeles de polimetacrilato modificados con folato presentaron una mayor captación celular selectiva en las células cancerosas que sobre-expresan receptores de folato [52, 53].

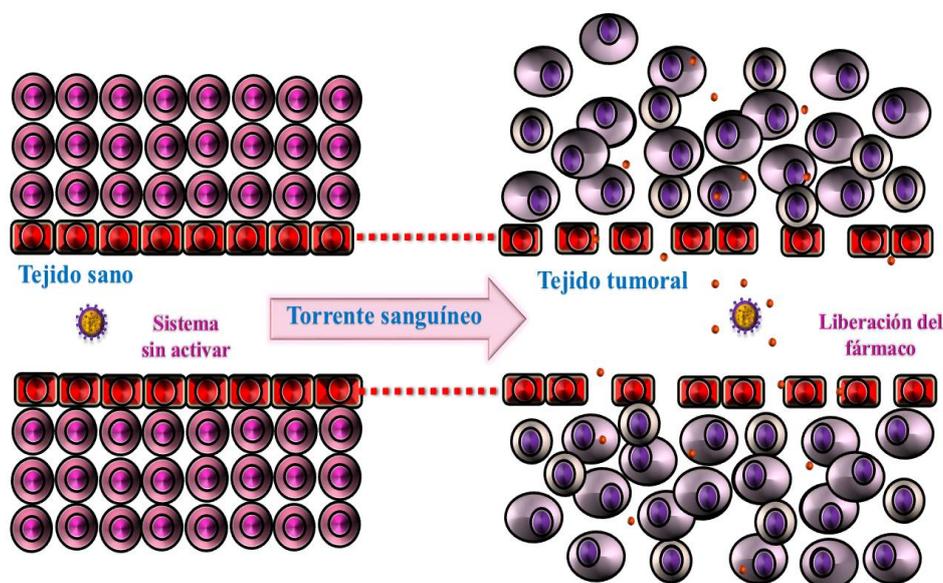


Figura 4. Mecanismo esquemático de liberación del fármaco incluido en los nanogeles en las células cancerosas como respuesta a la diferencia de pH del medio [2, 49].

### 2.1.5 La piel y sus afecciones

La piel es el órgano más grande y el más visible del cuerpo humano que constituye un área total de 2 m<sup>2</sup> aproximadamente. Como órgano externo se encuentra expuesto a muchos agentes nocivos que lo dañan a nivel celular. El sol puede proporcionarnos energía, pero una exposición prolongada es nocivo para la piel, la cual experimenta envejecimiento prematuro y/o cáncer [54].

El cáncer de piel es un proceso maligno común, como lo son el melanoma y cánceres no melanómicos, principalmente el carcinoma basocelular (CBC), y carcinoma de células escamosas. El CBC representa aproximadamente entre un 70% a un 80% de los cánceres cutáneos no melanoma, en la población de piel blanca y su tasa de incidencia se ha incrementado un 20% en las últimas 2 décadas. El cáncer de piel afecta una de cinco personas en algún momento de su vida [55, 56.].

#### 2.1.5.1 Cáncer de piel tipo Carcinoma Basocelular

El cáncer es el resultado de la falta de control de la reproducción celular en un tejido en el que, previa intervención de factores etiológicos sobre una o varias células, éstas se reproducen sin regulación ni finalidad, de forma autónoma, anárquica e irrefrenable aunque cese el estímulo causal, acompañándose de pérdida de la apoptosis. Aparece así un nuevo tejido, patológico, distinto del normal, con tendencia a expandirse localmente [57]. El carcinoma basocelular es un tumor maligno de origen epitelial y su origen son las células epidérmicas de los folículos pilosos o las células basales de la epidermis. Es cinco veces más común que el carcinoma escamo-celular, se caracteriza por un crecimiento lento y aunque rara vez produce metástasis, tiene capacidad destructora local [58].

Algunos medicamentos, tales como el Imiquimod y el 5-fluorouracilo (5-FU) que se usan para el tratamiento de CBC son hidrófobos. Se ha reportado que estos medicamentos resultan ser un tratamiento curativo eficaz en ciertos casos de carcinoma de células basales. Sin embargo, su baja solubilidad y biodisponibilidad hacen que sean difíciles para un uso práctico [59-61].

#### 2.1.5.2 Nanotecnología en el tratamiento del cáncer

Como se ha establecido anteriormente, el avance de la nanotecnología en la última década ha impulsado el desarrollo de numerosas aplicaciones médicas; pero ninguna tan

prometedora como la del uso de nanopartículas dirigidas para mejorar el tratamiento del cáncer. Debido principalmente a que la hidrofobicidad de los principios activos impide la correcta circulación de estos compuestos por la sangre, disminuyendo considerablemente su biodisponibilidad y aumentando el número de dosis requeridas para el paciente, con la ayuda de las nanopartículas esto puede mejorarse [2, 62]. Además, estos fármacos no son específicos, es decir, su mecanismo de acción es incapaz de discernir las diferencias existentes entre células sanas y células cancerosas, provocando en muchos casos daños irreversibles en tejidos y órganos sanos [62]. Una posible solución a este problema es el diseño de sistemas capaces de incorporar el fármaco en su interior con el objetivo de aumentar el tiempo de circulación en sangre y protegerlo de la degradación enzimática [2]. En la Figura 5 se muestra un esquema del interior de estos sistemas de tamaño nanométrico.

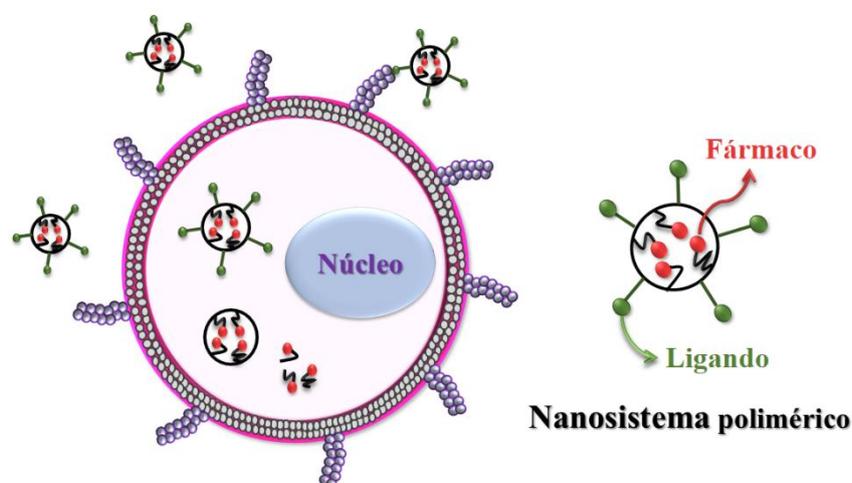


Figura 5. Esquema de la estructura interna de un tipo de nanosistema funcionalizado [2].

Por esto, la nanotecnología en el área médica se ha encargado de desarrollar y mejorar los sistemas de detección y entrega de fármacos dirigidos específicamente a células cancerígenas o tumorales, lográndose por medio de la observación de los cambios y variaciones de las propiedades que sufren este tipo de células (como la permeabilidad, retención y la actividad metabólica) diferenciándolas fisicoquímicamente de las células sanas con el fin de mantener a estas últimas intactas [63].

Se ha demostrado que la encapsulación de ingredientes activos farmacéuticos en micelas puede disminuir la extravasación o difusión del fármaco en tejidos normales y puede proveer una fijación pasiva del principio activo a tumores por medio del efecto de permeabilidad y retención potencializada (EPR, por sus siglas en inglés, enhanced

permeability and retention effect) [63, 64]. La EPR es debido a que hay una alta permeabilidad anormal en vasos sanguíneos tumorales combinada con la circulación prolongada de las micelas debido a la disminución de extravasación en vasos sanguíneos sanos, como se representa en el esquema de la Figura 6. Además, el rápido crecimiento del tumor crea un drenaje linfático pobre y los nanosistemas quedan atrapados en el microambiente tumoral [2, 49, 63, 64]. La incorporación de los fármacos, por ejemplo, en micelas Pluronic® puede aumentar la solubilidad, estabilidad y biodistribución, al mismo tiempo que mejora la farmacocinética [65-68].

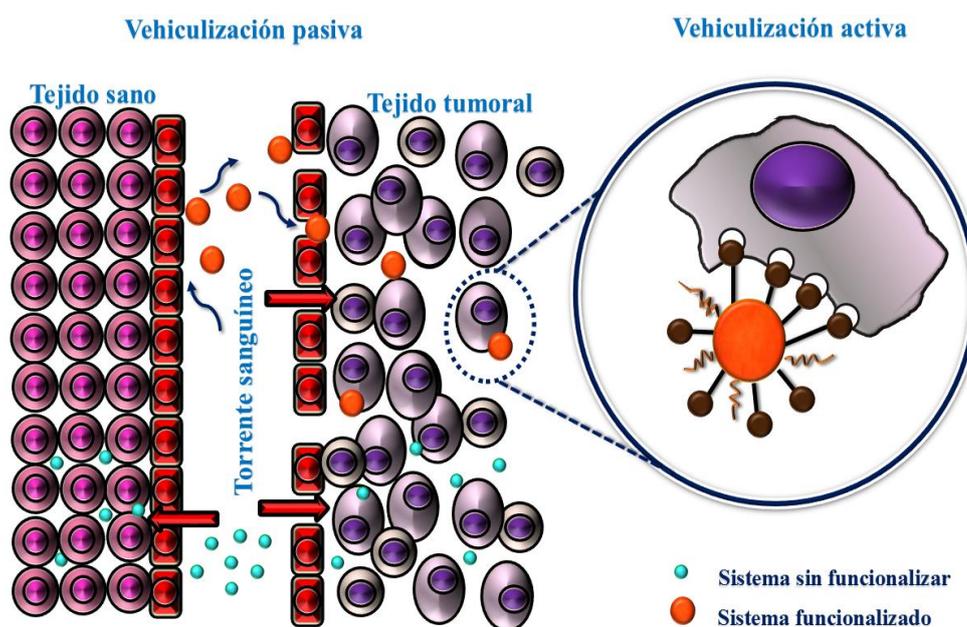


Figura 6. Esquemas de tipos de vehiculización de los sistemas a la diana de acción [2, 49].

### 2.1.5.3 Envejecimiento de la piel

Si la teoría de los radicales libres del envejecimiento es cierta, este estará presente a lo largo de toda la piel del cuerpo humano. Este órgano tiene la mayor carga de especies reactivas de oxígeno (ROS) que cualquier otro órgano, y en muchos casos se puede encontrar una clara correlación entre las ROS originadas por de los agentes externos e internos y un efecto pro-envejecimiento. Otra característica de este órgano es que el envejecimiento extrínseco afecta menos que el envejecimiento intrínseco. El envejecimiento intrínseco se describe como un resultado de factores genéticos y los cambios corporales que se producen/aparecen durante el proceso de envejecimiento natural, mientras que el envejecimiento extrínseco se centra en el proceso de envejecimiento acelerado por el medio ambiente [69]. El envejecimiento intrínseco

conduce a un desgrase epidérmico, así como de las capas de la dermis, volviéndose seca y perdiendo gradualmente la función de servir como una primera barrera protectora contra el medio ambiente. La piel va perdiendo la sensibilidad paulatinamente debido a la menor producción de hormonas sexuales y una disminución del número de terminaciones nerviosas. Por el contrario, si nos centramos en el envejecimiento extrínseco, parece que la piel se hace más gruesa y luego cambia su composición. El envejecimiento extrínseco es sinónimo de fotoenvejecimiento, como la radiación UV que tiene consecuencias graves para la piel expuesta [70]. En la dermis, la interrupción de la matriz extracelular juega un papel distinto que es cierto para el envejecimiento intrínseco, así como para el extrínseco. Los resultados son finas arrugas debido a la reducción de colágeno, fibras elásticas y ácido hialurónico [70]. La piel envejecida es susceptible a sequedad y picor generalizado, infección cutánea, trastornos autoinmunes, complicaciones vasculares y el aumento de riesgo de malignidad cutánea. De hecho, la mayoría de las personas mayores de 65 años tienen al menos un trastorno de la piel, y muchos tienen dos o más debido a la exposición continua de factores intrínsecos y extrínsecos a lo largo de la vida [69].

La radiación ultravioleta (UV) conduce principalmente a la génesis de ROS que son a su vez los principales contribuyentes al envejecimiento de la piel. Para subrayar la importancia de la radiación UV y la formación de ROS resultante en el proceso de envejecimiento de la piel, se ha creado el término "fotoenvejecimiento". La producción de ROS se debe principalmente a los rayos ultravioleta A (UVA), en el rango de 320-400 nm del espectro. Esta radiación comprende el mayor espectro de la radiación UV solar (90-95%) y se considera como el "rayo de envejecimiento". Los rayos UVA pueden penetrar la piel hasta una profundidad de aproximadamente 1,000  $\mu\text{m}$ , esto es, penetran más profundamente en la epidermis y la dermis de la piel que los otros rayos UV. Se ha demostrado que la amplia exposición los rayos UVA puede conducir a la formación de tumores benignos, así como cánceres malignos. Los rayos ultravioleta B (UVB) que corresponden al rango (280-320 nm) del espectro constituyen aproximadamente el 5% de la radiación solar total UV y es principalmente responsable de una variedad de enfermedades de la piel incluyendo, el cáncer tipo melanómico y no melanómico. La radiación UVB puede penetrar la piel hasta una profundidad de aproximadamente 160-180  $\mu\text{m}$  atravesando toda la capa de la epidermis y penetrando parte de la dermis en la piel humana (grosor desde 0.5 mm hasta 4 mm aproximadamente). Ambos rayos UVA y UVB contribuyen al fotoenvejecimiento [71, 72].

Para manejar estas fuentes de ROS, la piel ha desarrollado mecanismos antioxidantes sofisticados que son específicos de la piel. Los antioxidantes son moléculas que retardan o inhiben significativamente la oxidación de un sustrato oxidable, esto significa que cesan las reacciones en cadena destructivas iniciadas por ROS [73]. La mayoría de los antioxidantes muestran una concentración más alta en la epidermis que en la dermis. Esto se correlaciona bien con el hecho de que la carga de ROS es mayor en la epidermis que en la dermis [74].

La coenzima Q10 (CoQ10) es un antioxidante conocido por su influencia beneficiosa en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La ubiquinona se reduce a ubisemiquinona y ubiquinol en complejo I y II respectivamente de esta cadena y se oxida de nuevo a la ubiquinona en el complejo III. Debido a esta contribución significativa a la cadena de transporte de electrones, la ubiquinona ha sido descrita como un potente antioxidante. El ubiquinol o forma reducida de la coenzima Q10 (CoQ10-H<sub>2</sub>), es soluble en lípidos, es un interruptor de cadena de la peroxidación lipídica por lo que protege a los lípidos de la peroxidación; en comparación con las vitaminas C y E, la ubiquinona parece ser ineficaz en la fotoprotección [70].

Un tratamiento para la piel envejecida y fotodañada puede consistir de una combinación de varios antioxidantes como Resveratrol, Baicalina y Vitamina E que son parcialmente suficientes para lidiar contra la acción de los ROS en la piel de acuerdo a estudios reportados en la literatura [75].

El Resveratrol restaura al glutatión<sup>6</sup> lo que conduce a la mejora de la salud cutánea. El glutatión tiene un papel importante en el metabolismo de los nutrientes y la regulación de procesos celulares como apoptosis celular, proliferación celular, producción de citoquinas, respuesta inmune, expresión génica, síntesis de ADN y proteínas, por mencionar las más representativas [73, 76, 77].

Además, la combinación de CoQ10 con nanopartículas (cuya función es mejorar la permeabilidad) parece tener un efecto favorable sobre piel [78, 79]. Algunas sustancias adicionales parecen tener un efecto positivo sobre la apariencia cutánea, fundamentalmente en la epidermis. Un efecto favorable sobre la piel envejecida puede lograrse mediante el tratamiento con antioxidantes como CoQ10 solamente si se preserva el nivel de ROS originales de las células sanas [80].

---

<sup>6</sup>El glutatión es el antioxidante principal del organismo que incluso ha sido denominado "el antioxidante maestro". Tripéptido que se encuentra dentro de cada célula del cuerpo.

## 2.2 Planteamiento del Proyecto

### 2.2.1 Justificación

Cada vez son más las nuevas formulaciones o procedimientos tecnológicos que tratan de mejorar a los que se encuentran actualmente en el mercado farmacéutico, constituyendo una de los retos más trascendentales en el desarrollo e investigación de las formas farmacéuticas. Las tecnologías de sistemas fármaco-liberadores a menudo han demostrado ser populares entre las tecnologías de administración controlada de ingredientes activos farmacéuticos debido a la estabilidad de los componentes.

Las formas convencionales de administración de fármacos proporcionan una concentración en el plasma del principio activo, de forma que sus niveles crecen rápidamente y luego decaen a medida que éste es metabolizado, necesiándose dosis repetidas que en el mejor de los casos incomodan al paciente o en el peor lo intoxican, una manera de prevenirlo es prolongar el margen terapéutico por medio de nanosistemas. El nanoencapsulamiento de ingredientes activos farmacéuticos presenta varias ventajas sobre los sistemas convencionales como; el incremento de la solubilidad aparente de los medicamentos, aumento de la biodisponibilidad, la mejora de la penetración de sustancias a través de barreras biológicas [81]. Los nanosistemas han hecho que el desarrollo de productos de liberación controlada sea mucho más fácil que antes, mejorando la viabilidad de suministrar una amplia variedad de fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas, aunado a la capacidad de encapsular el principio activo para ser liberado a condiciones muy específicas y preparados con materiales biocompatibles.

A pesar de los progresos en el ámbito de la administración controlada de ingredientes activos farmacéuticos en los últimos años, se continúa invirtiendo grandes esfuerzos a la formulación de compuestos poco solubles en agua dentro de sistemas de liberación controlada con el fin de mejorar sus propiedades farmacológicas. El P123 ha demostrado características favorables para estos propósitos; no obstante, el control eficiente de la liberación de fármacos de este sistema todavía se está explorando. Alternativamente, de buscar un método para modificar la dosificación terapéutica de fármacos en el P123, está la conjugación con polímeros de PVP y PEG.

Partiendo de lo anterior, el presente trabajo de investigación, tiene como propósito diseñar un sistema de liberación controlada capaz de responder al estímulo de la temperatura cutánea y cuyos componentes sean biocompatibles. Preparar esta formulación para proporcionar alternativas para el tratamiento de CBC por medio de la

encapsulación de diferentes principios activos utilizando nanosistemas poliméricos para ser liberados localmente de forma controlada en el sitio afectado, de tal forma que se reduzca la posibilidad de aparición de efectos negativos ocasionados por los ingredientes activos farmacéuticos. Así como también, adicionar otra práctica para el tratamiento del envejecimiento cutáneo por medio de la conservación y liberación prolongada de antioxidantes.

### 2.2.2 Objetivo general

Desarrollar un sistema de liberación prolongada de fármacos por medio de nanopartículas poliméricas de base Pluronic® P123 y probarlos *in vitro*, en condiciones de la piel, con diferentes ingredientes activos farmacéuticos modelo generalmente aplicados para el tratamiento de carcinoma basocelular y el envejecimiento cutáneo.

### 2.2.3 Objetivos Específicos

- Preparación de nanosistemas poliméricos de base Pluronic® P123 con mezclas de PVP y PEG que funcionen como transportadores y encapsulamiento de ingredientes activos farmacéuticos poco solubles en agua.
- Seleccionar un método de cargado para la incubación de los fármacos antioxidantes (Resveratrol y Q10), y para el tratamiento del carcinoma basocelular (Imiquimod y 5-FU) en los sistemas preparados, partiendo de pruebas con la Indometacina que es un antiinflamatorio y una molécula modelo por su gran estabilidad y manejabilidad.
- Estudio de la morfología de los sistemas formulados sin carga por medio del microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés) y para los sistemas cargados con fármaco por medio del microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), para conocer tamaños y formas de los sistemas, así como sus diferencias entre sistemas con y sin carga de principio activo.
- Caracterización por medio del equipo de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) de los sistemas preparados durante 26 h para observar la estabilidad de las partículas preparadas y de los sistemas cargados con fármaco para determinar tamaños de partículas y carga superficial, esto es, potencial Zeta.

- Obtención los perfiles de liberación de los diferentes ingredientes activos farmacéuticos incubados en los sistemas vía *in vitro* a condiciones cutáneas (temperatura, pH, medio PBS).
- Estudios de Bioensayos con *Escherichia coli* (*E. coli*) de los sistemas preparados como confirmación de la no toxicidad de los mismos, así como de los sistemas con carga de fármaco para corroborar que la actividad farmacológica de los principios activos no se perdió durante los procesos de incubación.
- Evaluación de la estabilidad de los sistemas poliméricos con y sin carga en suspensión durante 24 horas por medio del equipo TurbiscanLab®

#### 2.2.4 Hipótesis

Se prepararán nanogeles de base Pluronic® P123, con mezclas físicas de PVP y/o PEG, que presentarán propiedades mejores o similares a su base, de transporte y encapsulamiento de principios activos. Es probable que la relación entre el recubrimiento de la micela P123 con PVP o PEG sea directamente proporcional con respecto al tiempo de liberación, al retener por más tiempo el principio activo dentro del sistema. Lo anterior haría que los nanogeles exhiban un mejor perfil de liberación de fármacos modelo como los utilizados para el tratamiento de CBC (Imiquimod y 5-FU) y para el envejecimiento cutáneo (Resveratrol, CoQ10), que la base sin modificar. De forma similar a la base, los sistemas no mostrarán toxicidad primaria.

## CAPITULO III. Desarrollo Experimental

### 3.1 Materiales y reactivos

Todos los reactivos y disolventes utilizados en el estudio fueron suministrados por Sigma-Aldrich (pureza del 98% o superior), y se manejaron tal como se recibieron, principalmente polietilenglicol (PEG) promedio Mn 10,000 Da Número CAS 25322-68-3, Pluronic® P123 (P123) promedio Mn 5,800 Da Número CAS 9003-11-6, poli-N-vinilpirrolidona (PVP) promedio Mn 40,000 Da Número CAS 9003-39-8. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico; esto incluye a los fármacos modelos: 5-fluorouracilo, Imiquimod, Resveratrol, CoQ10 e Indometacina.

#### 3.1.1 Polímeros

##### a) Pluronic P123

La nanotecnología basada en polímeros ha abierto una área importante para la farmacología, incluyendo elementos como micelas poliméricas, complejos de polímero-ADN, nanogeles, entre otros. De estos ejemplos los que presentan un gran potencial son los copolímeros en bloques o poloxámeros comercialmente llamados Pluronic® como una nanoplataforma para la administración del fármaco.

El Pluronic® P123 consiste en arreglos simétricos tribloques de polietilénóxido (PEO) hidrofílico y polipropilénóxido (PPO), de estructura PEO-PPO-PEO [64]. Debido a su característica de poseer uno o varios grupos hidrofílicos, estos copolímeros pueden interactuar con membranas biológicas, potencialmente es capaz de construir diversas agregaciones en un medio polar [67]. El P123 presenta una gran estabilidad en términos de concentración micelar crítica debido al carácter altamente hidrófobo del PPO, ésta propiedad es importante debido a que valores altos de concentración micelar crítica<sup>7</sup> aumentan la probabilidad de disociación de la micelas [68]. El núcleo de PPO representa un sitio de carga para la incorporación de agentes terapéuticos como fármacos hidrófobos. La capa de PEO protege al principio activo y disminuye las interacciones indeseadas del mismo con células y proteínas. Al mismo tiempo, se ha observado que las formas modificadas de P123 solas y/o mezcladas con otros polímeros tienen efectos menos tóxicos y más suministro específico de fármacos contra el cáncer [82].

---

<sup>7</sup>Concentración mínima de surfactante a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución.

### b) Poli-N-vinilpirrolidona (PVP)

Polímero hidrofílico de fórmula química  $(C_6H_9NO)_n$ ; que por sí mismo tiene la ventaja de una alta temperatura de transición vítrea<sup>8</sup> lo que aumenta su estabilidad a largo plazo en dispersión sólida, sobre todo es altamente soluble en agua y mejora la liberación de ingredientes farmacéuticos activos. Sin embargo, su mayor desventaja en cuanto a la estabilidad a largo plazo es su alta higroscopia; las dispersiones sólidas formuladas con PVP pueden absorber grandes cantidades de agua de la atmósfera, lo cual puede actuar como plastificante. El agua absorbida puede inducir también a una fase amorfa de separación o recristalización de los ingredientes farmacéuticos activos [83]. El PVP es comúnmente seleccionado como un compuesto polimérico modelo debido a su biocompatibilidad y su comportamiento termo-sensible, posee excelentes propiedades termo-físicas lo cual lo vuelve muy útil para la industria farmacéutica y cosmética. Dentro de los usos comunes para el PVP se pueden mencionar la protección de cultivos, sustituto de plasma sanguíneo, prolongación de la acción del principio activo, producción de detergentes, producción de acero, en la industria eléctrica y ampliamente usado para la síntesis de hidrogeles [84].

Además, el polímero PVP puede también emplearse como crioprotector y lioprotector, encontrándose que el PVP es el inhibidor más eficaz de la cristalización de fármacos durante el almacenamiento. A menor temperatura de almacenamiento, a 4 °C por ejemplo, puede aumentar significativamente el tiempo de inducción de la cristalización de los fármacos en los sistemas de matriz transdérmica [85].

### c) Polietilenglicol (PEG)

La fórmula química es representada como  $H(OCH_2-CH_2)_nOH$ . Este polímero es no inmunogénico y presenta propiedades anfifílicas o anfipáticas y neutras [86], tiene una amplia disponibilidad, bajo precio, no toxicidad (se requiere DL50<sup>9</sup> 50 g/kg para ser letal), su biodegradabilidad y alta solubilidad en agua (soluble en orgánicos como tolueno o diclorometano e insoluble en hidrocarburos alifáticos) evita que se acumule en los tejidos del cuerpo, y se puede descargar desde el cuerpo rápidamente sin efectos secundarios tóxicos [87]. Los compuestos de PEG se han utilizado en diversas áreas de la cosmética como antiagregante y/o plastificante; en la industria farmacéutica como un surfactante no

---

<sup>8</sup>Temperatura a la cual el material cambia su conformación amorfa por un mayor ordenamiento de sus cadenas internas.

<sup>9</sup> DL50 es la cantidad de una sustancia que provoca el 50% de la muerte de un grupo expuesto a ella.

iónico en la fabricación de comprimidos, y como aditivo en productos alimenticios actuando como estabilizador [88]. Algunas mezclas de bloques PEG con otros polímeros como por ejemplo, PEG combinando con ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) generan copolímeros PEG-PLGA, los cuales han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) debido a su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad [88].

Para reducir la interacción de los nanotransportadores con las proteínas del suero y extender el tiempo de circulación, la superficie del nanotransportador a menudo se modifica con polímeros inertes de carácter anfípatico, tales como PEG. El revestimiento óptimo para una larga circulación sanguínea debe incluir cadenas poliméricas de PEG de 2 a 5 kDa [26].

A pesar de que PEG presenta regularmente problemas de estabilidad a altas concentraciones de fármaco (superiores al 20 %P en peso de fármaco/PEG) que conduce a la cristalización, puede ser estabilizado con PVP, ya que tiene una alta temperatura de transición de vidrio (150-180 °C), que se reduce cuando se combina con PEG, lo que aumenta su aplicación como un portador [89-91]. Tanto los polímeros PEG y PVP tienen una excelente solubilidad, estabilidad química, capacidad de conformación de película, y biocompatibilidad que los hacen excelentes candidatos para la administración de ingredientes activos farmacéuticos. Un beneficio adicional de la mezcla de estos polímeros como nanotransportadores es el apoyo en la solubilidad de principios activos hidrófobos que representan 40% de los medicamentos farmacéuticos [92, 93].

### 3.1.2 Fármacos de uso cutáneo

#### a) Indometacina

La Indometacina es un antiinflamatorio. Polvo cristalino de color blanco o amarillo, prácticamente insoluble en agua, bastante soluble en alcohol (50 mg/mL). Se emplea en procesos inflamatorios posteriores a intervenciones ortopédicas, en síndrome dismenorreico y amenaza de parto prematuro. La Indometacina es un fármaco de Clase II<sup>10</sup> utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades de las articulaciones [94]. La indometacina interactúa con PVP en dispersiones sólidas a través de enlaces de hidrógeno formados entre el hidroxilo del fármaco y el polímero de

---

<sup>10</sup>De acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica los fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad pertenecen a la Clase II.

carbonilo, resultando en la ruptura de dímeros de Indometacina [95]. Se seleccionó como molécula modelo por su estabilidad a condiciones ambiente y fácil manejo.

#### b) L-Metionina

La L-Metionina es un aminoácido proteinogénico<sup>11</sup> hidrófobo y lipotrópico<sup>12</sup>. Es uno de los aminoácidos esenciales y no sintetizado por el organismo requiriéndose una ingesta del aminoácido. La metionina es utilizada en el organismo para producir una variedad de proteínas[96], por otra parte en su estructura contiene azufre auxiliar en la excreción de metales pesados. Igualmente, se ha encontrado que posee actividad hepatoprotectora [97] aunado al apoyo en reducción del nivel de histaminas inflamatorias en el cuerpo [98, 99]. La metionina es esencial para la formación de colágeno consumido para formar piel, uñas y tejido conectivo.

Un estudio demostró que los residuos de la metionina actúan como antioxidantes endógenos dentro del cuerpo al proteger regiones críticas de proteínas que contienen metionina [100, 101].

#### c) Resveratrol

El Resveratrol es un compuesto polifenólico de origen natural, que ha recibido mucha atención en los últimos años debido a sus propiedades como un potente antioxidante, un modulador de la expresión genética a través de la transducción de señales, un inhibidor de mediadores inflamatorios, y su capacidad para activar los receptores de estrógeno. Este antioxidante puede encontrarse en las uvas rojas y vinos en cantidades que va desde 0.5 a 10 mg/L [102]. El Resveratrol, cuando se aplica por vía tópica ha demostrado tener fuertes propiedades anti-proliferativas y quimio-preventivas contra la carcinogénesis de piel, así mismo da una notable protección contra el daño de la piel por la exposición a la radiación UVB. Esta combinación de propiedades biológicas y efectos cosméticos hace al Resveratrol un candidato único anti-envejecimiento [103].

La biodisponibilidad oral de Resveratrol es pobre, lo que lleva a un efecto irrelevante *in vivo* con la administración oral en comparación con su potente eficacia *in vitro*. El Resveratrol presenta una vida media corta de 8 a 14 min y se metaboliza ampliamente en el cuerpo [104, 105]. Así pues, el uso tópico parece tener un bajo riesgo

---

<sup>11</sup>Aminoácidos proteinogénicos son aquellos que forman parte de las proteínas y que están codificados en el material genético.

<sup>12</sup>Sustancia que favorece el metabolismo hepático de los lípidos.

y los beneficios son potenciales. Los derivados sintéticos de Resveratrol pueden permitir aplicaciones más específicas, aunque la forma nativa es con frecuencia más potente en la capacidad de absorción de radicales libres que las vitaminas antioxidantes y derivados actualmente usados [106].

Por consiguiente, es cada vez más importante descubrir cómo mejorar la biodisponibilidad y bloquear el metabolismo del Resveratrol. La permeabilidad de Resveratrol a través de la piel es una alternativa atractiva a la administración oral tanto para aplicaciones tópicas y transdérmicas.

#### d) Coenzima Q10

La coenzima Q10 es un importante compuesto lipofílico de baja biodisponibilidad (la mayoría de CoQ10 a partir de fuentes comerciales es soluble en lípidos), antioxidante y efecto anti-apoptóticos producido por el cuerpo. La cantidad de CoQ10 en la piel disminuye con la edad; se ha encontrado que la aplicación tópica de esta sustancia a la piel humana puede ser eficaz para reducir la profundidad de las arrugas, así como para proteger la piel del daño por radicales libres, la inflamación y envejecimiento prematuro causado por exposición al sol [107].

La solubilidad en agua de la CoQ10 es pobre y en muchos casos nula debido a que es una molécula cristalina altamente hidrofóbica y esto se ve afectado al utilizarla como suplemento alimenticio. Para ello es necesario encontrar compuestos de recubrimiento que puedan favorecer la mejora de la solubilidad de la misma.

#### e) 5-Fluorouracilo

El principio activo farmacéutico 5-Fluorouracilo (5-FU), fue uno de los primeros fármacos utilizados en oncología. Perteneciente a la familia de las pirimidinas el 5-fluorouracilo es el agente anticancerígeno de aplicación tópica más ampliamente estudiado y utilizado, ha sido aprobado por la FDA para su aplicación como tratamiento antitumoral, su estructura molecular es como la del uracilo pero con un hidrógeno sustituido por un átomo de flúor [108].

Al ser un antimetabolito<sup>13</sup> inhibe la síntesis de la timidilato sintetasa, a la vez que por ser muy similar a la timina puede intercalarse con los nucleótidos y así interferir en la síntesis del ARN y ADN y como consecuencia provoca fallas en la división y

---

<sup>13</sup>Sustancia que reemplaza, inhibe o compite con un metabolito específico, esto es, con cualquier producto derivado de los procesos químicos corporales (metabolismo).

crecimiento celular causando muerte celular. Como una alternativa a las cirugías se ha utilizado la aplicación tópica de 5-fluorouracilo, para tratamiento de CBC [109, 110].

f) Imiquimod

Imiquimod es un fármaco inmunoestimulante aprobado en 1997 por la FDA, para el tratamiento de verrugas genitales externas y perianales. En 2004 su uso se ha extendido para el tratamiento de enfermedades de la piel neoplásicas, tales como la queratosis actínica y el CBC superficial y como adyuvante<sup>14</sup> para la vacunación [111].

El Imiquimod es una amina imidazoquinolina modificadora de la respuesta inmunitaria, que estimula la inmunidad celular innata y adquirida, ejerce su actividad a través de la unión a los receptores, que participan en la respuesta del sistema inmune innato [112, 113]. Presentando los antígenos a los linfocitos T memoria. La actividad antitumoral está dada por la disminución de la proliferación celular y un incremento en la expresión de TIMP-1 (inhibidor de la angiogénesis, que es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes), así como un incremento de la susceptibilidad de los signos proapoptóticos [112].

### 3.1.3 Cepa bacteriana *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), empleadas en este trabajo para las pruebas de bioensayos de los nanosistemas poliméricos con y sin carga de fármaco son la TOP10 *E. coli*, de la marca Invitrogen® No. C4040-10; que fueron cultivadas normalmente en medio de cultivo LB en una incubadora a 32 °C (para simular la temperatura de la piel) con agitación continua a 100 rpm.

Las bacterias *E. coli* son gram-negativas, en forma de bacilos del tipo anaeróbico facultativo y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria es un habitante común en los intestinos de todos los animales, incluyendo el de los humanos y es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular que, junto con otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo.

---

<sup>14</sup>Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune.

### 3.1.4 Medios de cultivo y soluciones

Para cultivar las bacterias en el laboratorio se deben satisfacer todos los requerimientos físicos y de nutrientes del microorganismo que se requiere que crezca. Los medios de cultivo sólidos, medios en agar, son descritos en la Tabla 4, o líquidos, medios en caldo, descritos en la Tabla 5, proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo se han utilizado los siguientes medios de cultivo y soluciones:

#### I. Agar Luria-Bertani

El agar Luria-Bertani (LB) se utilizó como medio de cultivo y mantenimiento de cepas recombinantes de *E. coli* que generalmente son usadas para estudios moleculares y genéticos. Para el caso de estudios de bioensayo, el agar fue empleado para realizar el conteo de número bacteriano, además de una primera prueba cualitativa para los nanosistemas poliméricos sin cargar. Para hacer la preparación se disolvieron los reactivos en 0.5 L de agua desionizada; luego se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. En la Tabla 4 se muestra la composición del agar LB.

Tabla 4. Composición del agar LB

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	12 g

#### II. Caldo Luria-Bertani

El caldo de Luria-Bertani (LB) se utilizó para el mantenimiento y la propagación de la bacteria *E. coli*. El caldo LB sirvió como medio para el crecimiento bacteriano para los estudios de bioensayo con los sistemas poliméricos con y sin carga. La cepa *E. coli* crece más rápido en caldo LB por la levadura de triptona y factores de crecimiento esenciales para este tipo de bacteria. El caldo LB dispone de electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico, debido al componente cloruro de sodio.

Los siguientes reactivos fueron preparados en 1 L de agua desionizada y posteriormente esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. La Tabla 5 muestra la composición del caldo LB.

Tabla 5. Composición del caldo LB

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g

### III. Solución PBS

La solución tampón o Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente utilizada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. En la Tabla 6 se describe la composición amortiguadora PBS en 250 mL de solución madre 10X.

Tabla 6. Composición de la solución tampón PBS

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	20 g
Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )	0.5 g
Dihidrogenofosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.6 g
Hidrogenofosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	3.6 g

Además, esta solución amortiguadora es recurrente utilizada como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida. Esta monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación.

La solución tampón PBS se empleó como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal, por lo que se manejó como medio en los estudios de fármaco-liberación.

## 3.2 Métodos de preparación

### 3.2.1 Preparación de materiales nanopoliméricos

El material base y la primera muestra, del cual se partió en este estudio es el Pluronic P123 (P1). Se prepararon dos muestras de mezclas físicas con PVP y PEG como se

describe a continuación. La primera mezcla (P2) se preparó con una relación en peso de 1:1 de P1 y PVP respectivamente y se disolvió en agua destilada. A continuación, la temperatura de la muestra se aumentó hasta 100 °C con una rampa de calentamiento de 5 °C min<sup>-1</sup>, hasta que todo el agua se evaporó. La segunda mezcla (P3) se preparó mediante el mismo método, pero conteniendo P2 y PEG con una relación en peso de 1:1, con una relación final de 1:1:2 de P123, PVP y PEG respectivamente considerando las propiedades del material descrito en la sección 2.1 materiales y métodos.

### 3.2.2 Curvas de calibración de fármacos

Se realizaron curvas de calibración para todos los ingredientes activos, farmacéuticos y antioxidantes. Se prepararon soluciones en diferentes concentraciones de fármaco en PBS para lograr este objetivo. Las características son descritas en la Tabla 7, y se determinó la densidad óptica de cada una de las sustancias mediante un espectrofotómetro UV-vis HACH DR 5,000. Los resultados se muestran en la Tabla 7 con sus respectivas longitudes de onda. Con estos valores se calculó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), cuya importancia radica en que a valores altos de este parámetro en una sustancia, mayor será la absorbancia de ese compuesto y por lo tanto, mayor será la sensibilidad del método que lo emplea.

Tabla 7. Longitud de onda<sup>15</sup>, rango de dilución y coeficiente de extinción<sup>16</sup> de fármacos.

Fármaco	Longitud de onda nm	Concentraciones mg/mL		Coeficiente de extinción molar (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	
		Inicial	Final	Inicial	Final
Indometacina	267	0.02	0.87	7,643.3	947.67
L- Metionina	204	0.02	0.50	2,056.2	428.23
Resveratrol	253	0.02	2.15	9,097.2	258.22
Coenzima Q10	275	0.02	1.00	1,726.0	690.40
5-Fluorouracilo	265	0.02	0.06	12,727.0	4,920.50
Imiquimod	226	0.02	1.75	720.0	205.71

<sup>15</sup>Las longitudes de onda fueron tomadas de las hojas de seguridad de Sigma Aldrich y se corroboraron con el espectrofotómetro.

<sup>16</sup>La capacidad que tiene una sustancia química para absorber cierta longitud de onda.

### 3.2.3 Métodos de cargado para los nanosistemas poliméricos

Para seleccionar el método de carga que mejor se acoplara al nanosistema polimérico preparado, se realizó un primer ensayo con P1 cargado con Indometacina de tres diferentes procedimientos: a) cargado por placas, b) difusión sin liofilizar y c) difusión con liofilizado.

El polímero y fármaco se disolvieron en dos soluciones por separado, en la primera se disolvió el polímero en un medio acuoso con una concentración de 10 mg/mL y en la segunda se disolvió la Indometacina en 70% v/v de etanol-agua con una concentración final de 1 mg/mL del fármaco. Se prosiguió de la siguiente manera para cada uno de los incisos posteriores.

- a) Por placas: primero se mezclaron ambas soluciones anteriormente descritas. A continuación, se transfirió la solución fármaco/polímero al sistema de placas mediante una jeringa. El sistema consistió en dos placas de vidrio que se mantuvieron unidas por abrazaderas metálicas. El conjunto se colocó dentro de un horno durante 6 horas a 37 °C, después se incrementó la temperatura desde 37 °C, en pasos de 5 °C min<sup>-1</sup>, hasta que se alcanzó los 70 °C y se mantuvo así por 12 h. Se continuó con el estudio de fármaco-liberación.
- b) Difusión: sin liofilizar: una vez que se disolvieron las soluciones del fármaco y el polímero, se mezclaron las soluciones y la disolución resultante fármaco/polímero se dejó en agitación a <100 rpm durante 24 h a temperatura ambiente. Luego se continuó con el perfil de liberación del fármaco.
- c) Difusión: liofilización: cuando se disolvió la mezcla fármaco/polímero, se dejó en agitación durante 24 h la solución de fármaco/polímero a las mismas condiciones que el inciso b). Después de 24 h, se añadió sacarosa al 100 g/L como lioprotector para las estructuras poliméricas y se dejó en agitación durante toda la noche. Por último, se liofilizó por 24 h en el equipo Labconco-FreeZone 2.5 L.

En la sección 2.2.4 se describe el procedimiento para la obtención de los perfiles de liberación del fármaco por el método de diálisis.

### 3.2.4 Método de carga y mecanismo de fármaco-liberación

Se prepararon dos grupos de soluciones diferentes. El primer conjunto consistió en tres soluciones, cada una con un tipo diferente de formulación (P1, P2 y P3) a una concentración de 10 mg/mL disuelto en agua destilada. El segundo conjunto contiene las soluciones de todos los fármacos hidrófobos utilizados, tomando como ejemplo (también para la nomenclatura) al 5-FU, estos se disolvieron en 70% v/v de etanol-agua a una concentración de 1 mg/mL. Una vez que las soluciones, de cada una de las formulaciones, se disolvieron completamente, se mezclaron con la solución del fármaco, como por ejemplo;  $F1 = P1 + 5\text{-FU}$ ,  $F2 = P2 + 5\text{-FU}$  y  $F3 = P3 + 5\text{-FU}$ , manteniendo una agitación magnética moderada por 24 h a temperatura ambiente. El mismo desarrollo se repitió para todos los fármacos.

Posteriormente, a las soluciones se les añadió 100 g/L de sacarosa como lioprotector; después, se congelaron las muestras por 2 h a temperatura  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y enseguida se liofilizaron. La liofilización se realizó en un FreeZone 2.5 L Benchtop Freeze Dry Sistema de Labconco [114].

El método por diálisis que fue empleado para la obtención de perfiles de liberación del fármaco se describe a continuación. Una vez liofilizadas las muestras cargadas con fármaco, se colocaron en 7 mL de solución PBS a pH 7.4, a temperatura ambiente. La solución resultante se vertió en 10 cm de tubo de diálisis Spectra/Pore con un corte de 12,000-14,000 Da. El tubo de membrana con la solución en su interior, se dializó en PBS a  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  (temperatura de la piel) con agitación de 100 rpm [115].

Las primeras dos muestras (1 mL) se midieron a 15 y 30 min, y enseguida las muestras fueron tomadas cada hora hasta que se obtuvo la liberación completa del soluto. La liberación de fármacos fue seguida por espectroscopía UV-vis HACH DR 5000 a sus respectivas longitudes de onda (Tabla 7) y con curvas de calibración previamente preparadas. La carga de soluto se calculó a partir de la cantidad de fármaco liberado una vez que se observó la liberación completa [116].

### 3.2.5 Bioensayos con *E. coli*

A los sistemas nanopoliméricos preparados (P1, P2 y P3), sin haber sido cargados, se les realizaron dos estudios. El primer estudio se hizo con agar (cualitativamente) y segundo con caldo nutritivo (cuantitativamente) donde se observó el comportamiento de la bacteria *E. coli* con los diferentes sistemas preparados. El propósito del bioensayo para

las formulaciones de polímeros cargados es determinar la eficacia de los medicamentos, corroborar que durante el método de cargado no hayan perdido su funcionalidad, que finalmente servirá como la parte cuantitativa de la actividad farmacológica en las condiciones utilizadas.

*E. coli* se inoculó en un medio LB para caldo o agar, según corresponda, a 32 °C (para ser probadas a las condiciones de la piel) con agitación continua de 200 rpm a pH 7.4. Varios medios de crecimiento bacteriano se prepararon con *E. coli*, el primero fue el blanco (sin nanopolímeros) que contenía únicamente a la bacteria y los segundos con las formulaciones poliméricas después de liofilizar (sección 2.2.3 c)) y esterilizados (P1, P2, P3 y por último los polímeros cargados con fármaco. Se tomaron alícuotas cada 2 h para obtener la densidad óptica por espectroscopia UV-vis para cada muestra de caldo bacteriano durante 50 h a  $\lambda = 600$  nm. Para los cultivos en agar, se incubaron las placas durante 48 h a 32 °C.

### 3.3 Caracterización de los sistemas nanopoliméricos

#### 3.3.1 Preparación de muestras para HRTEM

La morfología de las muestras poliméricas se caracterizó usando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución. Las muestras se prepararon a una concentración de polímero de 0.5 mg/mL en alcohol isopropílico usando disolventes de calidad grado reactivo y se dispersaron por medio de baño ultrasónico para evitar la agregación de partículas. A continuación, se depositó una gota sobre rejilla de cobre recubierta de carbono, seguido de eliminación del exceso de disolvente utilizando papel de filtro fino. A continuación las muestras se analizaron en condiciones de 200 kV utilizando un equipo JEOL JEM-2010, como el que se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Fotografía del HRTEM

### 3.3.2 Preparación de muestras para SEM

Las muestras poliméricas cargadas se hidrataron con agua desionizada durante dos días para permitir que los geles alcanzaran el estado hinchado máximo. Posteriormente, los geles hinchados se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente fueron liofilizados. Los productos liofilizados se examinaron con un microscopio electrónico de barrido marca Zeiss MA EVO 15 como se muestra en la Figura 8, para observar la morfología de las muestras. Las condiciones del equipo fueron una presión variable y un voltaje de aceleración de 15 kV. Las micrografías revelaron detalles de la morfología de la superficie de las nanopartículas poliméricas y su tamaño [117].



Figura 8. Fotografía del SEM

### 3.3.3 Dispersión de luz dinámica y potencial Zeta

El diámetro hidrodinámico de los sistemas poliméricos con y sin carga de fármaco se midió usando el equipo de DLS de HORIBA ZS100 que funciona con el principio de la espectroscopia de correlación de fotones. Las muestras se dispersaron en agua destilada a una concentración de  $0.1\text{ mg/mL}$ . Se tomaron 2 mL de cada una de ellas colocándose en una celda desechable de poliestireno y se expusieron al láser en un ángulo de  $90^{\circ}$  para obtener los perfiles de difracción. Las mediciones de potencial Zeta se hicieron usando electrodos de oro utilizando el mismo equipo de DLS de HORIBA ZS100 que se muestra en la Figura 9. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, pero en este caso, para verificar la reproducibilidad de los resultados de la distribución del tamaño y potencial Zeta, fueron hechos por quintuplicado.



Figura 9. Fotografía del DLS

### 3.3.4 Retrodispersión de luz por TurbiscanLab®

Para evaluar la estabilidad de la dispersión y fenómenos de aglomeración de las formulaciones poliméricas en el agua, el comportamiento de sedimentación dependiente del tiempo fue investigado por las mediciones del perfil de la transmisión utilizando un equipo de TurbiscanLab® Formulaction que se muestra en la Figura 10. Los cambios que pudieran ocurrir a nuestros nanogeles en términos de tamaño y concentración, como floculación o coalescencia en condiciones reales se registraron. Este estudio se realizó sólo para los sistemas poliméricos libres de ingredientes activos farmacéuticos y para los sistemas cargados con los principios activos más representativos tales como; Imiquimod, 5-FU y Resveratrol. Estos resultados son una referencia para determinar la estabilidad de todos los nanogeles cargados. Las formulaciones se introdujeron en una celda de vidrio cilíndrica (~ altura 38 mm) a 25 °C. El análisis de cada muestra se llevó a cabo cada 30 min durante 50 ciclos.

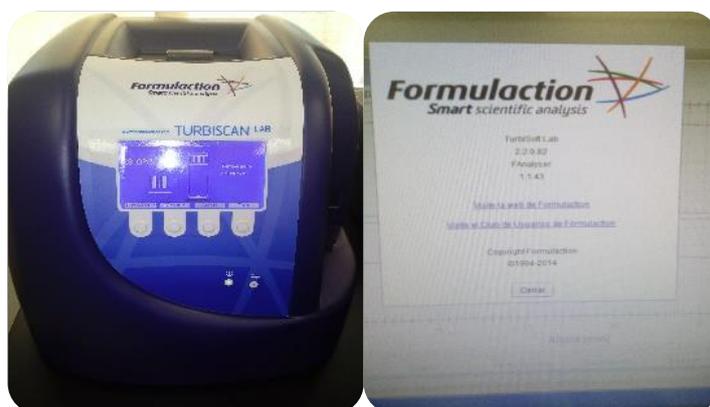


Figura 10. Fotografía del TurbiscanLab®

## CAPÍTULO IV. Resultados y Discusiones

## 4.1 Formulaciones de sistemas poliméricos

Las formulaciones preparadas y descritas en este trabajo difieren en los resultados de los perfiles de apariencia, tamaño y liberación. En lo que se refiere a la apariencia, en la Figura 11 puede observarse que P1 presenta un gel transparente, P2 mostró una coloración ambarina, y P3 mostró un producto de gel blanco.

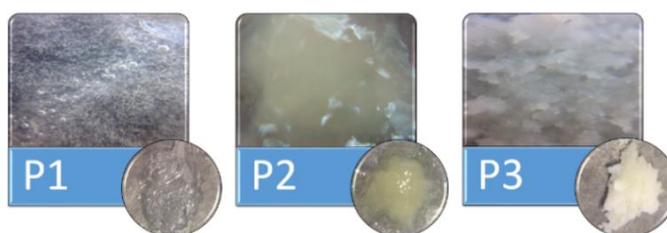
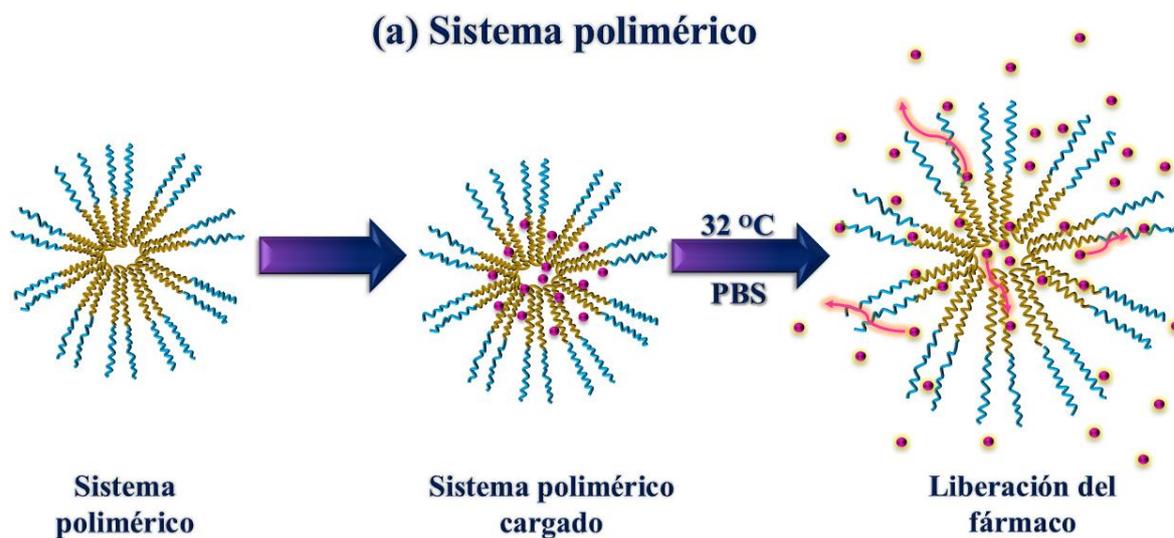


Figura 11. Fotografía de los sistemas poliméricos preparados.

En los siguientes esquemas de la Figura 12, se propone la liberación del principio activo desde la matriz del sistema polimérico hacia el medio a través de varios mecanismos, entre ellos la difusión a través de la matriz del polímero, la liberación del fármaco, o la difusión a través de canales en la matriz del polímero (Figura 12, flechas color rojo en la última ilustración de cada inciso). De acuerdo a la literatura, la liberación al medio se produce principalmente a través de la difusión. El perfil de liberación *in vitro* de fármaco desde el sistema polimérico se ve afectado principalmente por su núcleo hidrofóbico interno. En estudios ya reportados se ha demostrado que el fármaco está atrapado físicamente en el núcleo hidrofóbico de las micelas y es lo que limita la liberación del principio activo [66].



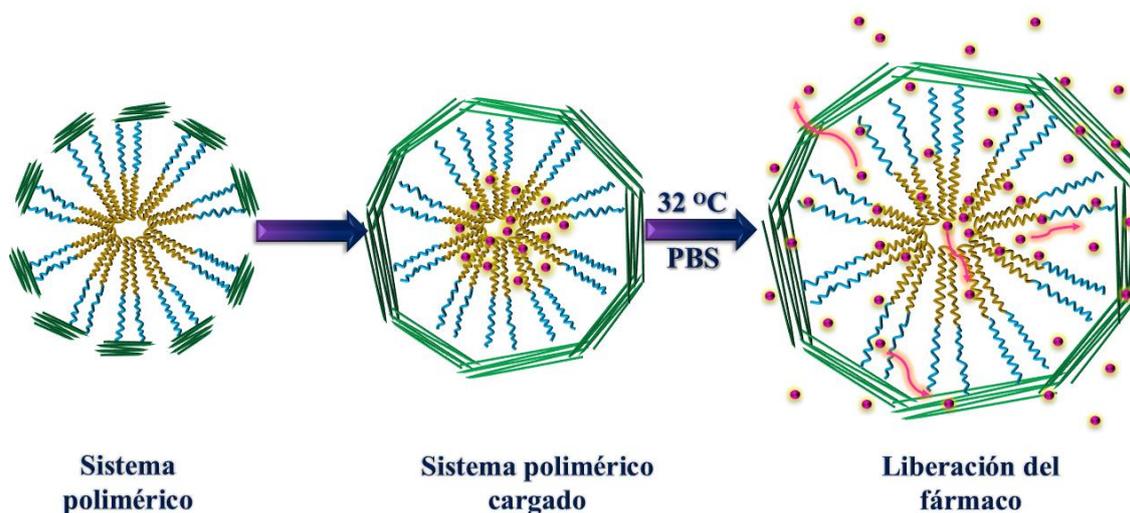
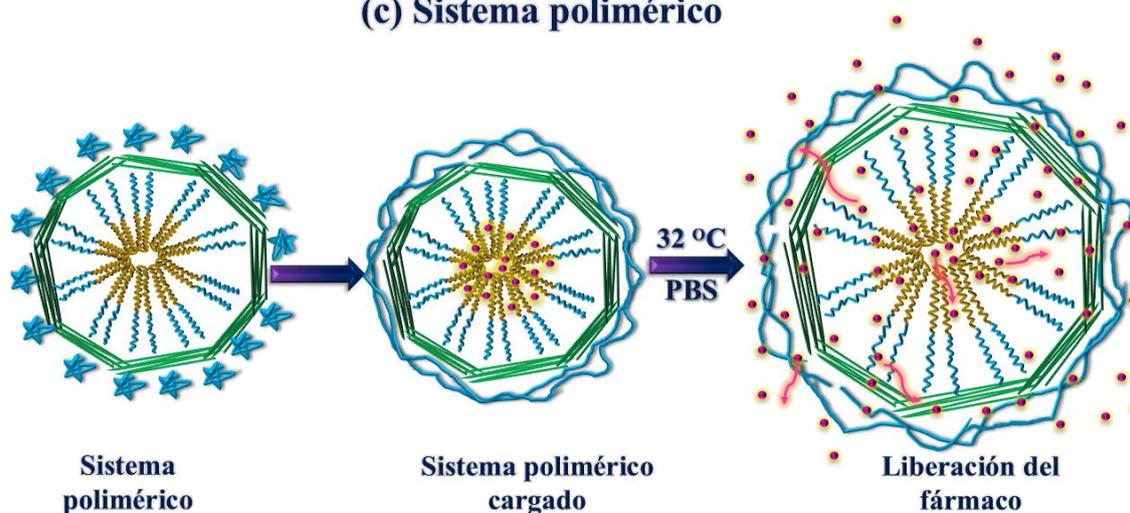
**(b) Sistema polimérico****(c) Sistema polimérico**

Figura 12. Esquema de los sistemas poliméricos (lado izquierdo de cada figura) y mecanismo (propuesto) de fármaco-liberación en respuesta a la temperatura (lado derecho de cada figura). (a)P1, (b)P2 y (c)P3.

#### 4.2 Morfología por HRTEM

Una vez preparados los polímeros P1, P2 y P3 se caracterizaron por HRTEM y se obtuvieron una serie de micrografías que permitieron observar el tamaño y morfología de

los sistemas poliméricos. Asimismo, comprobada la formación de las micelas base, se caracterizaron por HRTEM a los tres sistemas poliméricos cargados con diferentes ingredientes activos farmacéuticos. Se observó el cambio morfológico y se llevó a cabo la comparación de tamaño y morfología antes y después del proceso de cargado.

#### 4.2.1 Sistemas poliméricos libre de fármacos

Las micrografías de los nanogeles poliméricos sin cargar, en su estado hinchado, muestran partículas semi-esféricas con forma irregular y tamaños inferiores a 200 nm como puede observarse en la Figura 13. Asimismo, se observa que los nanogeles tienden a unirse y formar aglomerados de mayor tamaño. La muestra P1 presentó partículas semi-esféricas de <30 nm de diámetro como se muestra en la Figura 13 (a-d). Asimismo, se observó que la muestra P2 consiste de nanopartículas de <50 nm de diámetro, lo cual es favorable para aplicaciones médicas específicas. La muestra de P3 mostró distribución de tamaño irregular de partículas con forma semi-esférica con diámetros mayoritariamente <100 nm como se muestra en Figura 13 (i-l).

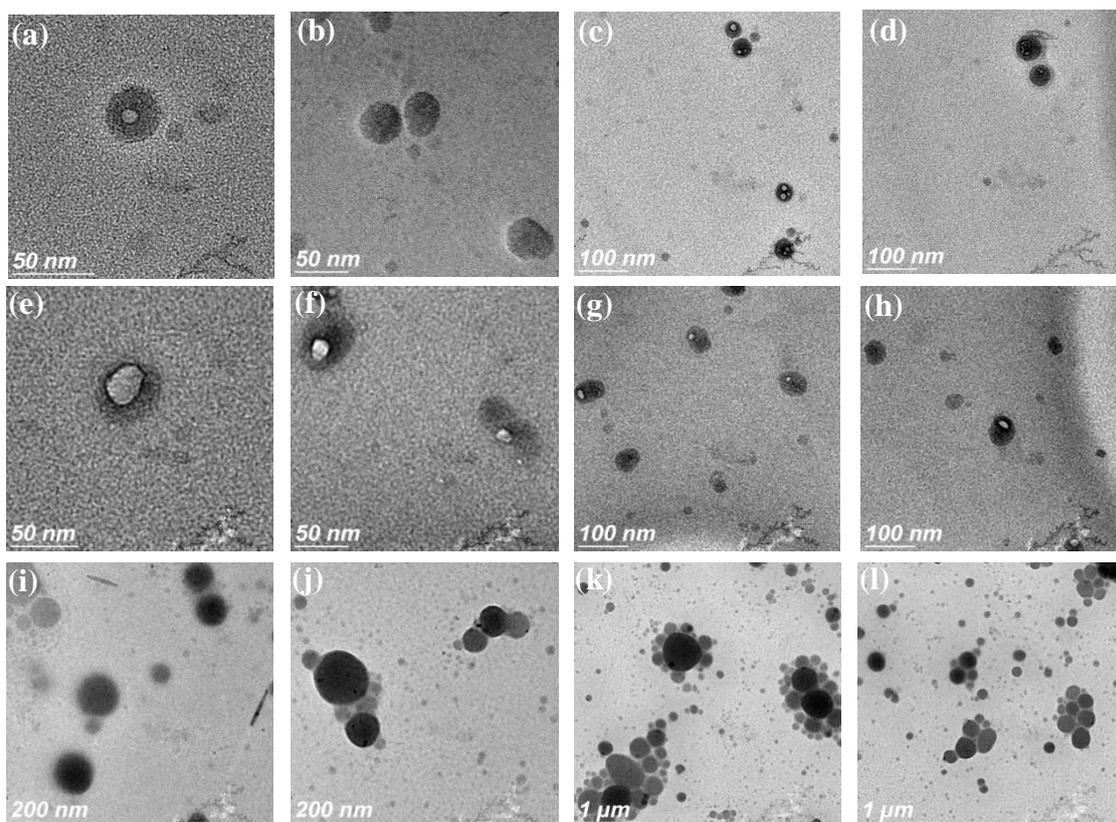


Figura 13. Micrografías de HRTEM a diferentes escalas donde se observan los sistemas poliméricos de las muestras (a-d)P1, (e-h)P2 y (i-l)P3.

Cabe hacer notar que los tamaños de las partículas poliméricas preparadas son adecuadas para las pruebas de liberación de fármacos, puesto que en promedio mostraron tamaños de diámetro menores a 100 nm, por esta razón se les denomina como nanosistemas poliméricos. Por otro lado, las partículas observadas en las micrografías exhiben una tendencia a aglomerarse como es de esperarse debido a su bajo valor de potencial Zeta, inferior a  $-5$  mV (Tabla 8).

#### 4.2.2 Polímeros cargados con Indometacina

En la Figura 14 se observa la morfología de las partículas poliméricas cargadas con Indometacina. Se puede observar una forma circular con tamaños que varían de 400 nm a  $1.5 \mu\text{m}$  y que forman aglomerados mayores de  $1 \mu\text{m}$ . Para los sistemas poliméricos cargado con Indometacina presentan la misma forma circular definida con tamaños mayores a un micrómetro, sin mostrar aglomeraciones, además de que también se observan algunos sistemas poliméricos dispersos. Los sistemas poliméricos cargados muestran formas circulares más definidos que los sistemas polímeros sin cargar.

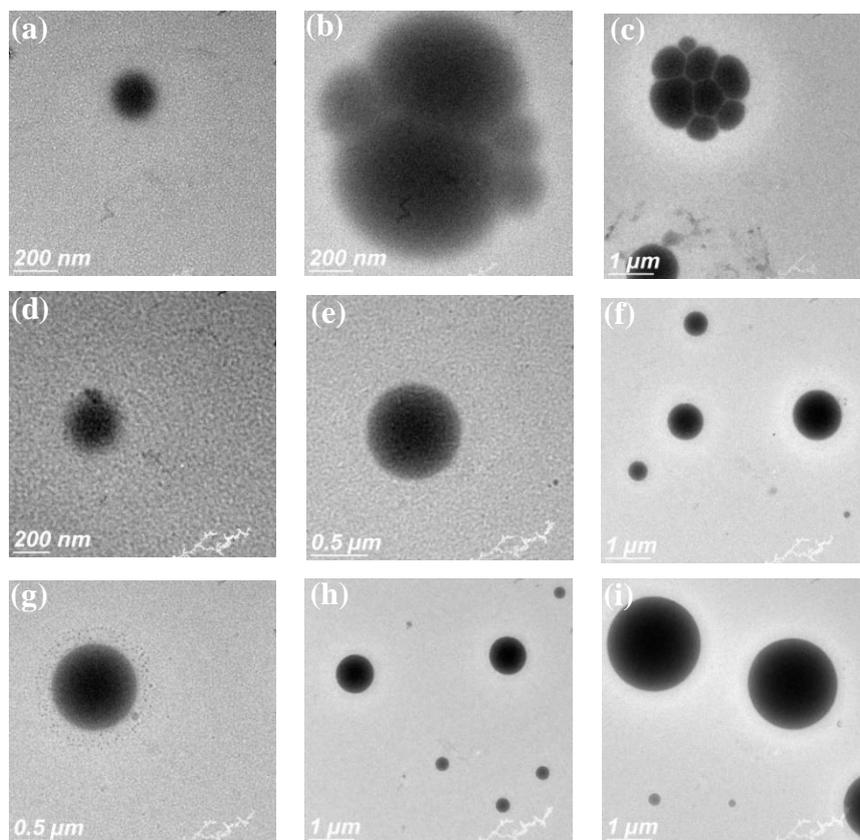


Figura 14. Micrografías de HRTEM a diferentes escalas donde se observan los sistemas poliméricos cargados con Indometacina (a-c)I1, (d-f)I2 y (g-i)I3.

Los polímeros cargados de Indometacina tienen en su núcleo un tono más oscuro que corresponde al principio hidrófobo rodeado por una cobertura polimérica con un tono más claro, una especie de corona hidrofílica. En la literatura, se ha demostrado con estudios de rayos X y calorimetría de barrido diferencial que el fármaco se encuentra atrapado físicamente en el núcleo hidrofóbico de las micelas [66]. Por esta razón, las micelas aumentan de tamaño. Sin embargo, no hay control sobre la cantidad de ingrediente activo farmacéutico que está atrapado en cada micela, y como resultado encontramos variaciones en los tamaños. Es válido suponer que las partículas que contienen más del fármaco en el interior son más grandes en comparación con las que contienen menos del principio activo.

Una característica fisicoquímica de las mezclas de copolímero tribloque PEO<sub>20</sub>-PPO<sub>70</sub>-PEO<sub>20</sub>, (P123) es su tendencia a formar agregados por sí mismos (como se muestra en las Figura 13 (b) y (d), polímeros sin cargar). Además de esto, es muy probable que las soluciones de los ingredientes activos farmacéuticos promuevan la agregación de las partículas (como se muestra en la mayoría de las micrografías de polímeros cargados). Un estudio ha revelado que un crecimiento en tamaño de agregado ocurre tanto a causa de la incorporación de hidrocarburos (PEG, PVP o inclusive podría ser el fármaco) a P123, así como el aumento en el número de moléculas de copolímero bloque por agregado [118]. Como bien se demuestra en las micrografías de micelas cargadas y sus bajos valores en potencial Zeta.

#### 4.2.3 Polímeros cargados con 5-FU

HRTEM se utilizó para proporcionar información sobre la topografía de la superficie de la muestra. En HRTEM, las gotitas de formulaciones micelares presentaron esferas homogéneas observadas en la Figura 15. Las micelas formuladas cargadas están bien dispersadas con una ligera tendencia a aglomeraciones como el caso de la Figura 15 (c). Todas las micrografías presentaron forma esférica para las muestras analizadas. Como se muestra en la Figura 12, se representó esquemáticamente la posible organización del copolímero P123 y sus mezclas con PVP y PEG. La envoltura exterior atribuida al PEG o PVP hidrófilo en el copolímero P123, y el núcleo interno deben referirse al PPO hidrófobo, y el fármaco se dispersó en las micelas poliméricas.

En la Figura 15 se observan diferentes tamaños de las partículas micelares, con una forma esférica con una coloración gris clara en el exterior, y en el interior se aprecia una

tonalidad gris oscuro. Algunas de las micrografías presentan pequeños gránulos o cúmulos, lo que probablemente representa partículas del principio activo encapsulado.

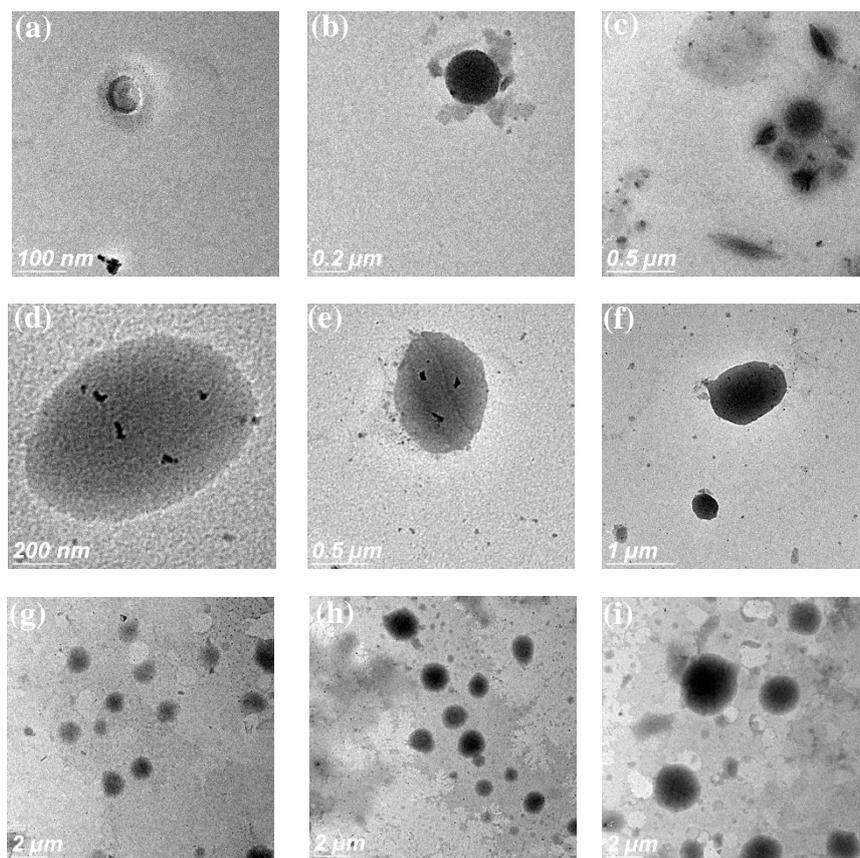


Figura 15. Micrografías de HRTEM a diferentes escalas donde se observan los sistemas poliméricos cargados con 5-FU (a-c)F1, (d-f)F2 y (g-i)F3.

Una cualidad favorable que le podemos percibir a la amplia distribución de diámetros de las partículas poliméricas, es que estas micelas se pueden posicionar en diferentes capas epidérmicas, accediendo a una extensa área para la distribución y entrega del principio activo, de tal forma que, se comprenda mayor área de acción.

#### 4.2.4 Polímeros cargados con Imiquimod

La morfología de micelas cargadas con Imiquimod se examinó utilizando HRTEM y se muestra en la Figura 16; esta reveló que las formulaciones eran de forma esférica con buena dispersión de los sistemas D1 e D2, en cambio para D3 se observó una tendencia a la aglomeración. Esta dispersión se originó por el proceso de liofilización que sobrellevaron las cadenas hidrofílicas de micelas, tales como el PEG expuesto a la superficie de las partículas [26]. De acuerdo a la estructura de los sistemas podría inferirse

que las cadenas hidrófobas de PPO en P123 formaban el núcleo micelar, con terminales hidrófilos PEO, PVP y PEG de P123 en las formulaciones P1, P2 y P3 respectivamente, que componen la corona hidrofílica y que son los responsables de la dispersión de las partículas. Los resultados corroboraron que las formulaciones preparadas con mezclas de monómeros de PVP y PEG no tienen ningún efecto visible sobre la integridad de los sistemas.

El tamaño promedio de los sistemas poliméricos sin carga de polímero es de 20, 50 y 100 nm para P1, P2 y P3, respectivamente. En comparación con los sistemas poliméricos cargados con tamaños más grandes de 400 nm a 1.5  $\mu\text{m}$ , cabe indicar que las partículas con tamaño arriba de 100 nm se tomaron más fácilmente con TEM.

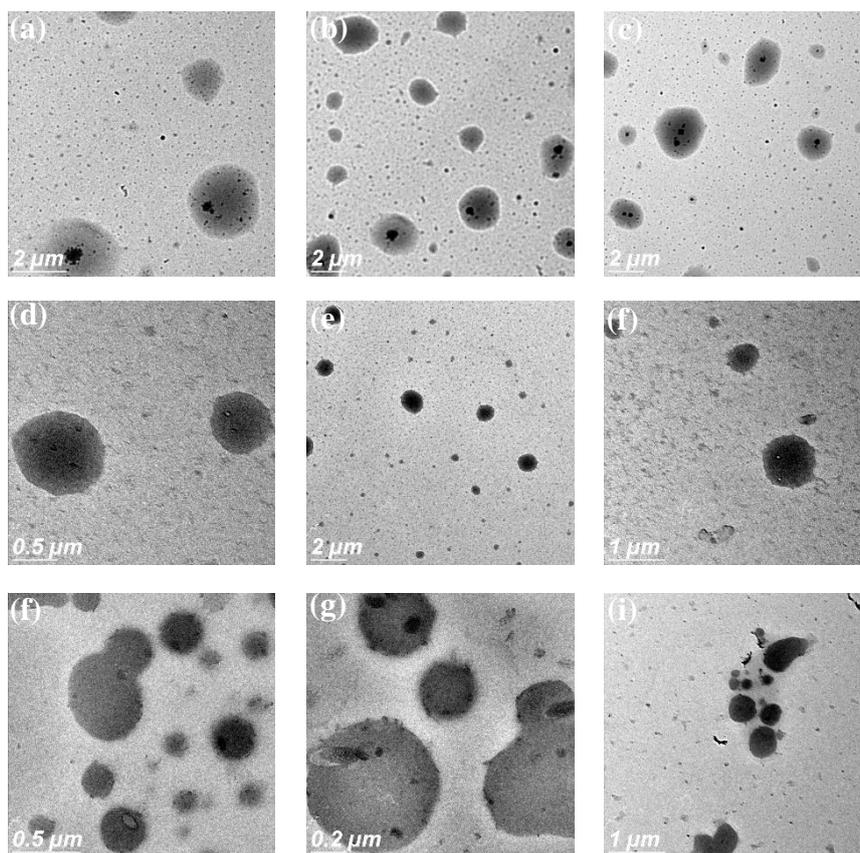


Figura 16. Micrografías de HRTEM a diferentes escalas donde se observan los sistemas poliméricos cargados con Imiquimod (a-c)D1, (d-f)D2 y (g-i)D3

El diámetro promedio más pequeño de los sistemas poliméricos sin cargar fue cercano a 25 nm, aunque, la carga con fármaco en los sistemas poliméricos afectó visiblemente su tamaño y distribución de tamaño. El aumento del tamaño promedio de los sistemas poliméricos cargados podría interpretarse mediante la encapsulación de los ingredientes activos farmacéuticos dentro del sistema. Un posible beneficio de los

sistemas poliméricos cargados aumenten tanto en tamaño en comparación a los sistemas sin cargar, es que al ser más grandes las partículas cargadas estas se pueden quedar en las partes superficiales de la piel mientras liberan gradualmente el principio activo. Por consiguiente, al ir liberando el fármaco el diámetro de la partícula disminuye permitiendo que se vaya infiltrando entre las capas cutáneas y así se sostenga una mejor distribución de los ingredientes activos farmacéuticos.

### 4.3 Morfología por SEM

El uso de SEM con presión variable ha permitido observar muestras no conductivas e hidratadas durante periodos de tiempo limitados. Las muestras se pueden analizar a una presión de cámara más alta (hasta 250 Pa) para evitar la carga superficial y mejorar la resolución de la imagen [117].

#### 4.3.1 Polímeros cargados con Resveratrol y Q10

La Figura 17 muestra las micrografías de los nanogeles cargados (con Coenzima Q10: Q1, Q2 y Q3; con Resveratrol: R1, R2 y R3), observándose esferas de distintos tamaños, que van desde nanómetros (marcados con flechas) hasta micrómetros.

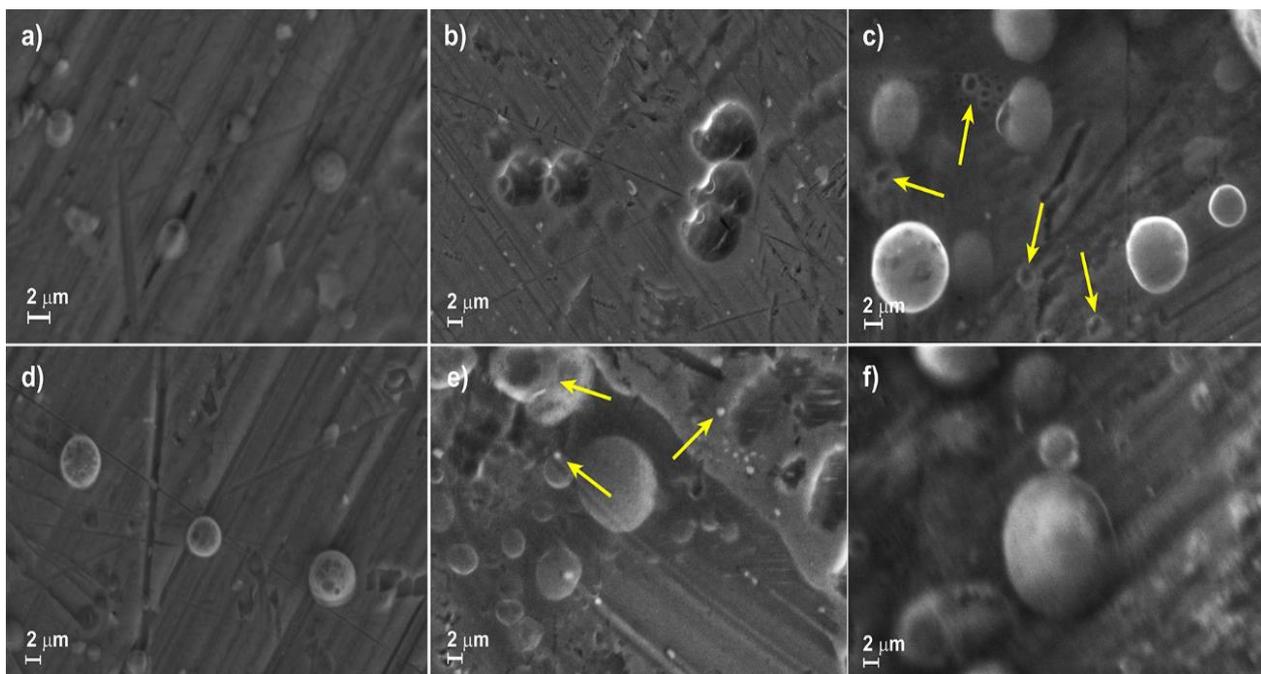


Figura 17. Micrografías de SEM de los sistemas poliméricos cargados con fármacos antioxidantes. (a) Q1, (b) Q2, (c) Q3, (d) R1, (e) R2 y (f) R3.

En las micrografías se perciben cambios significativos en las dimensiones de los sistemas poliméricos cargadas en comparación con los sistemas sin cargar. Se puede observar que en las muestras cargadas hay una mayor cantidad de racimos, que consisten de pequeñas partículas poliméricas atribuidas a fenómenos de coalescencia durante la preparación de las muestras. Los sistemas poliméricos cargados con fármaco que mejor se percibieron son aquellas de tamaños mayores a 2  $\mu\text{m}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, las diferencias de diámetros de las partículas poliméricas, nos puede permitir situar los sistemas poliméricos en diferentes niveles de las capas epidérmicas, conviniendo una amplia zona para la distribución del fármaco.

#### 4.4 Curvas de calibración

Las curvas de calibración obtenidas para los fármacos se llevaron a cabo por medio del espectrofotómetro UV-vis HACH DR 5000 a sus correspondientes longitudes de onda (Tabla 7). Las curvas se obtuvieron en varias disoluciones de fármaco en PBS (para simular el líquido extracelular). Como se puede observar en la Figura 18 la tendencia de las curvas es en su totalidad un comportamiento exponencial, esto es de esperarse debido a que los principios activos son poco solubles en el medio, de modo que una adición de fármaco no necesariamente es un aumento proporcional en la densidad óptica.

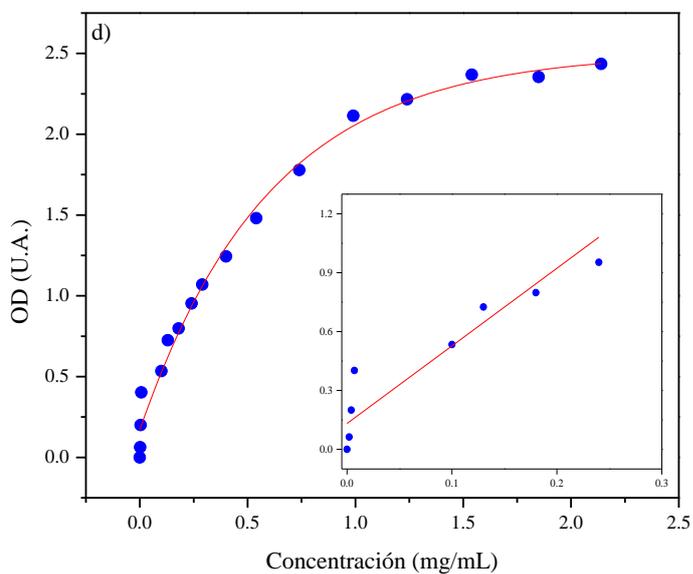
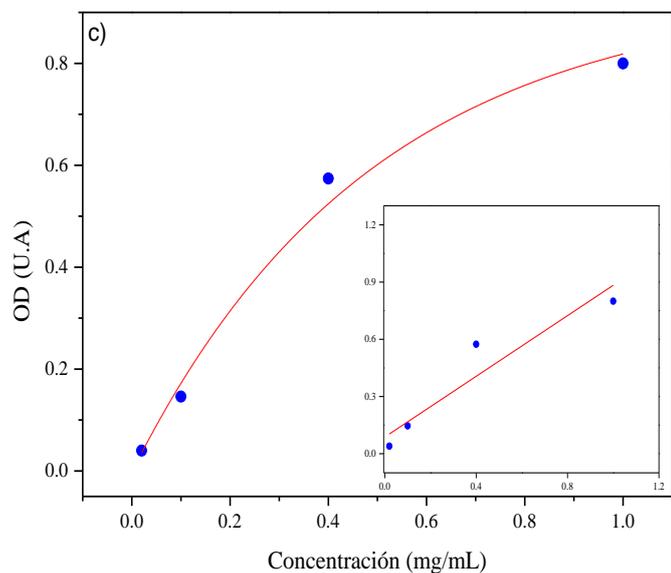
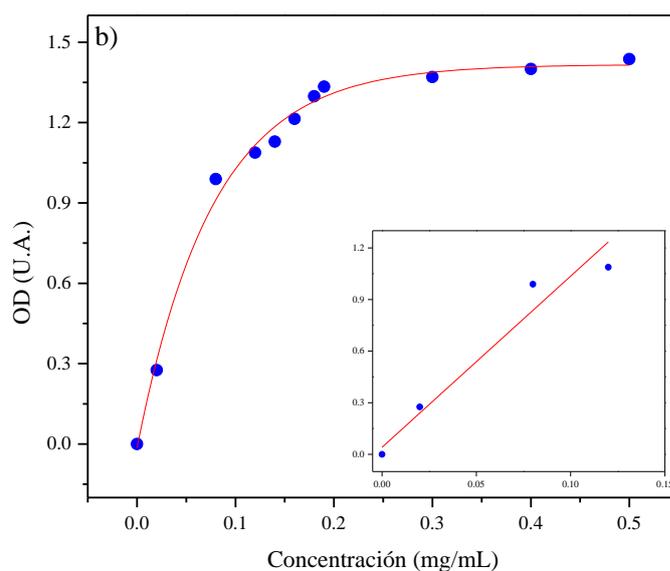
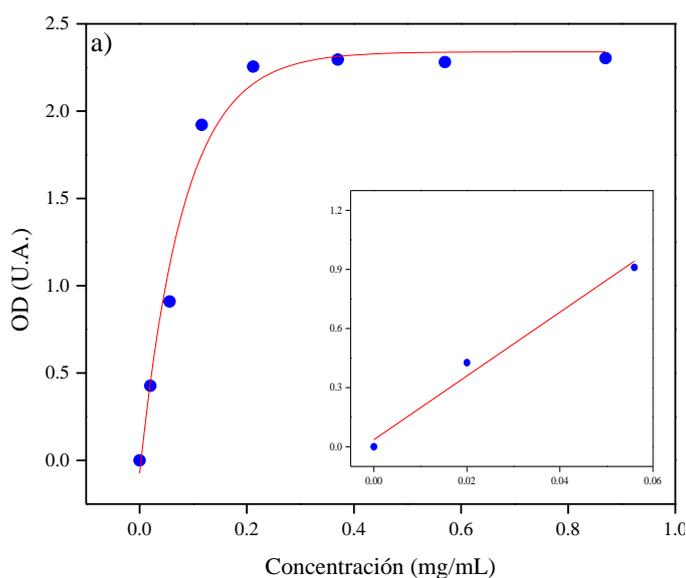
Como se pudo observar todas las curvas presentaron un ajuste numérico<sup>17</sup>. Esto es probablemente debido a *desviaciones instrumentales* que ocurren en la zona de alta absorbancia donde se producen desviaciones como consecuencia de que la luz que logra pasar la muestra es casi nula y se confunde con el ruido de fondo. Del mismo modo, pueden ocurrir *desviaciones químicas* de la ley de Beer, producto de que las especies que componen la muestra interactúan de tal forma que cuando la especie absorbente está involucrada en una reacción de equilibrio ocurre que por esta interacción se desvía de la linealidad, suceso que es muy común a altas concentraciones.

La ley de Beer dice que una curva de calibración de absorbancia *versus* la concentración de analito debería ser una línea recta. A pesar de ello, en muchos casos, las curvas de calibración no son lineales. La limitación fundamental a la ley de Beer se da por dos argumentos. Primero, a mayores concentraciones, las partículas individuales de

---

<sup>17</sup>Ajuste numérico: es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre variable.

analito ya no se comportan independientemente entre sí. La interacción resultante entre partículas de analito puede cambiar el valor del coeficiente de extinción. Segundo, es que los valores del coeficiente de extinción dependen del índice de refracción de la muestra y dado que el índice de refracción varía con la concentración del analito, los valores de los coeficientes de extinción cambiarán. Para concentraciones suficientemente bajas de analito, el índice de refracción permanece esencialmente constante, y la curva de calibración es lineal.



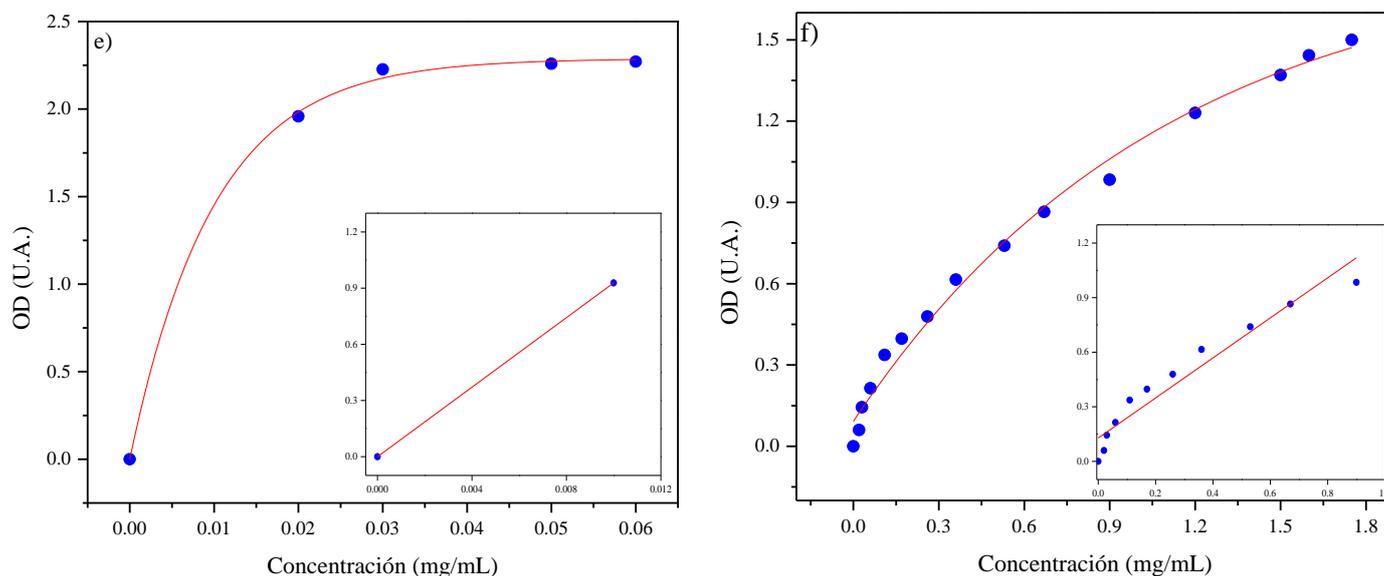


Figura 18. Curvas de calibración para los fármacos: a) Indometacina, b) L-Metionina, c) Q10, d) Resveratrol, e) 5-FU y f) Imiquimod. Recuadros de ajustes lineales.

#### 4.5 Métodos de cargado de nanopolímeros

Un primer estudio se realizó para determinar que método de cargado para los nanosistemas poliméricos es el más favorable para el tipo de sistemas de este estudio. Aunque, se utilizaron tres métodos distintos, en todos se implantó el fármaco en el núcleo hidrofóbico del sistema por el fenómeno de difusión y tomando el nanosistema P1 como referencia al haber sido la base de los sistemas poliméricos preparados.

En la Figura 19 se muestra que a las primeras 5 h del estudio los perfiles de fármaco-liberación son muy similares entre ellos, siendo el método de cargado por platos el que presentó una liberación del fármaco ligeramente superior, seguido por el método de difusión sin liofilizar y al último con liofilizado. El método de cargado por platos ~7 h se observó una diferencia cada vez mayor de la cantidad de fármaco liberado terminado a las 20 h, a este tiempo también se acabó la liberación del fármaco el método de cargado sin liofilizar con aproximadamente 22 % y 19 % respectivamente. Sin embargo, el método de cargado por difusión con liofilizado continuó la liberación hasta las 60 h y con una liberación del principio activo farmacéutico de aproximadamente el 27 %.

El mejor método para cargar los sistemas poliméricos es el de difusión con liofilización (Sección 2.2.3 inciso c, para mayor descripción de la técnica), debido a que presentó una liberación más prolongada por aproximadamente 60 h y con mayor cantidad del principio activo liberado con, que los otros dos métodos empleados.

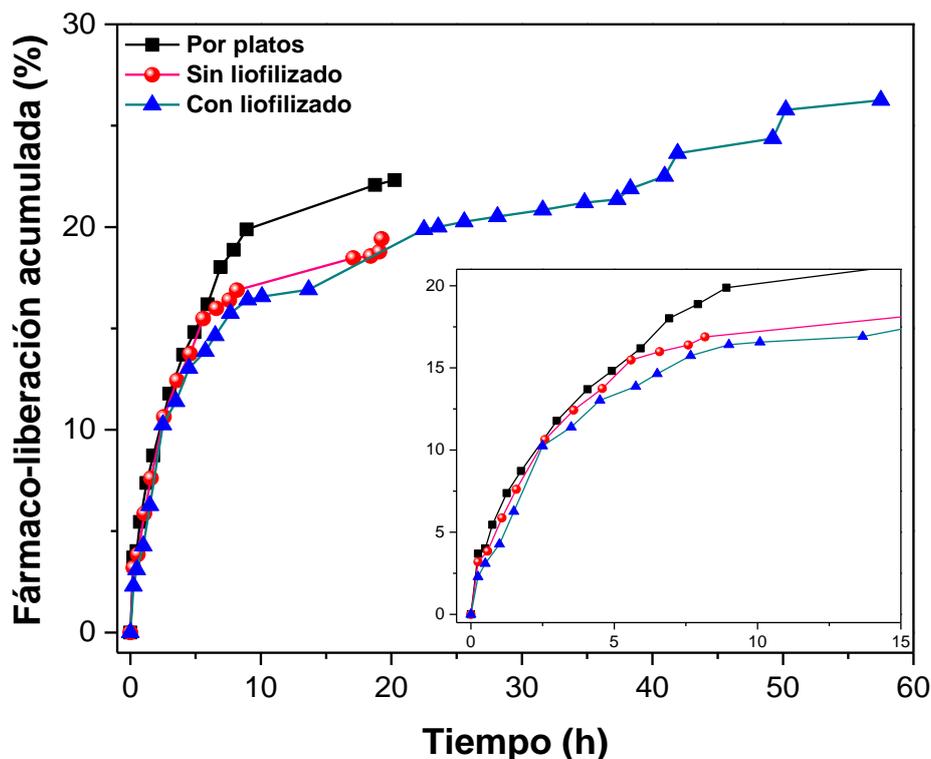


Figura 19. Efecto del método de cargado en los sistemas poliméricos sobre la fármaco-liberación. Recuadro: acercamiento de las primeras 15 h de liberación

Los resultados mostraron que un aumento de temperatura durante el proceso de cargado de las nanopartículas induce una disminución en el grado de interacción del fármaco con la micela; esto puede ser útil para las formulaciones de liberación controlada.

#### 4.6 Perfiles de fármaco-liberación

Los perfiles de fármaco-liberación se llevaron a cabo por el método de diálisis en medio de la solución amortiguadora PBS a temperatura de 32 °C (temperatura a la cual se encuentra la piel humana) y con agitación de 100 rpm.

##### 4.6.1 Antiinflamatorio Indometacina

En la Figura 20 se muestra el comportamiento de liberación de fármacos de los polímeros cargados con Indometacina, los cuales se designan I1, I2 e I3. Se distingue que durante la primera hora aproximadamente 6% del principio activo encapsulado fue liberado. A las tres horas, se logró una liberación de aproximadamente el 10% para las tres muestras, observando que la liberación del fármaco aumentó de manera exponencial con respecto al tiempo, hasta que obtuvo una liberación prolongada después de las seis

horas de experimentación con una liberación entre 10% y 16%. Este gráfico indicó un comportamiento constante entre las 6 h y 35 h, liberando un porcentaje de ~18%. Al mismo tiempo, se pudo apreciar que el polímero cargado I2 presenta la mejor liberación de los tres polímeros, con un 56% de liberación de Indometacina durante un período de tiempo de aproximadamente 53 h, seguido por I1 que tiene un patrón de liberación similar con un ligero desplome de la fármaco-liberación en aproximadamente un 10% durante las primeras 35 h, con una diferencia del ingrediente activo farmacéutico liberado en un 23% en 46 h frente a I2, dando una diferencia de liberación de fármaco final de 27% a las 54 h con respecto a I2. Después de las 50 h se puede observar un impulso en el incremento en la liberación del fármaco efecto conocido como *burst*. Debajo de los polímeros I1 e I2 descritos anteriormente están los valores observados para I3 que sólo lograron una liberación del 15% a las 14 h.

No obstante, todos los polímeros presentaron una tasa de liberación del principio activo a través de la membrana de diálisis más alta que el blanco (Indometacina pura, sin ningún sistema nanopolimérico) que liberó sólo el 11% en 11 h. Por consiguiente, se puede afirmar que los sistemas poliméricos formulados lograron su propósito de liberar más principio activo y en un mayor periodo de tiempo que su contraparte el blanco.

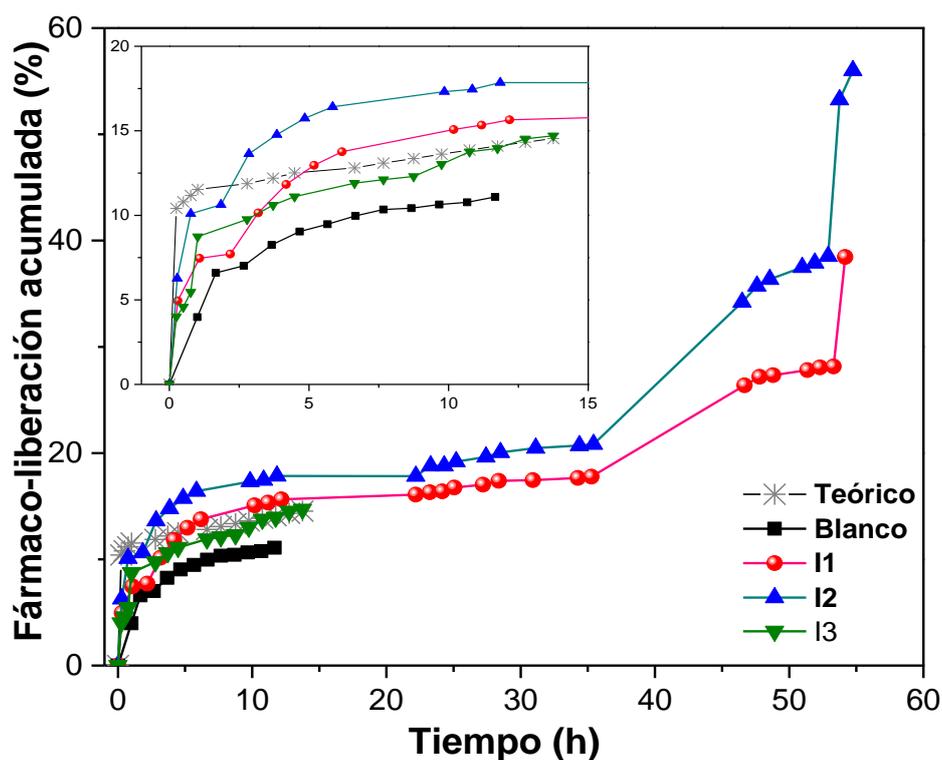


Figura 20. Perfiles de liberación de los sistemas cargados con Indometacina I1, I2, I3; blanco y curva de liberación teórica. Recuadro: acercamiento de las primeras 15 h de liberación.

En resumen, con base en las mismas condiciones y parámetros adoptados para este estudio, los sistemas P1 y P2 fueron los que mostraron mejor perfil de liberación prolongado, siendo P2 el que liberó una mayor cantidad de fármaco de estos dos sistemas. P3 exhibió la cantidad de liberación de principio activo más pequeña y en menor tiempo. En consecuencia, es posible afirmar que la adición de PVP en el sistema base denominado como P2 mejoró el perfil de liberación del fármaco.

Para los sistemas poliméricos cargados con Indometacina, se realizó una primera aproximación a un modelado matemático del perfil liberación y la curva teórica se observa en la Figura 20 (Anexo A.1). Así mismo, se realizó un estudio de FT-IR únicamente para estos sistemas I1, I2 e I3 (Anexo A.2).

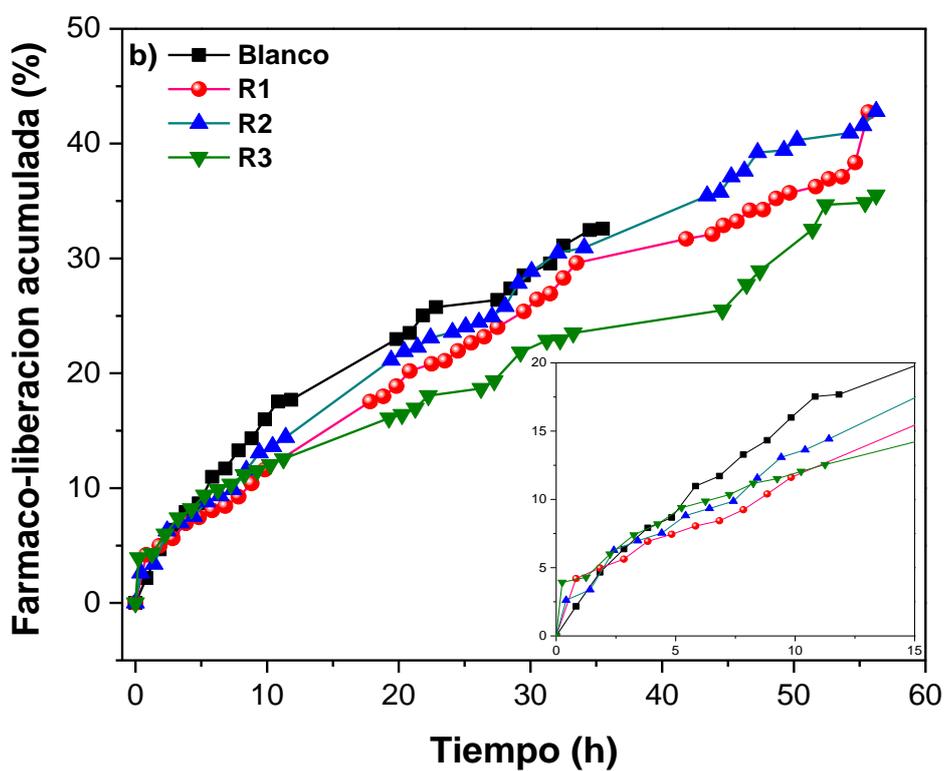
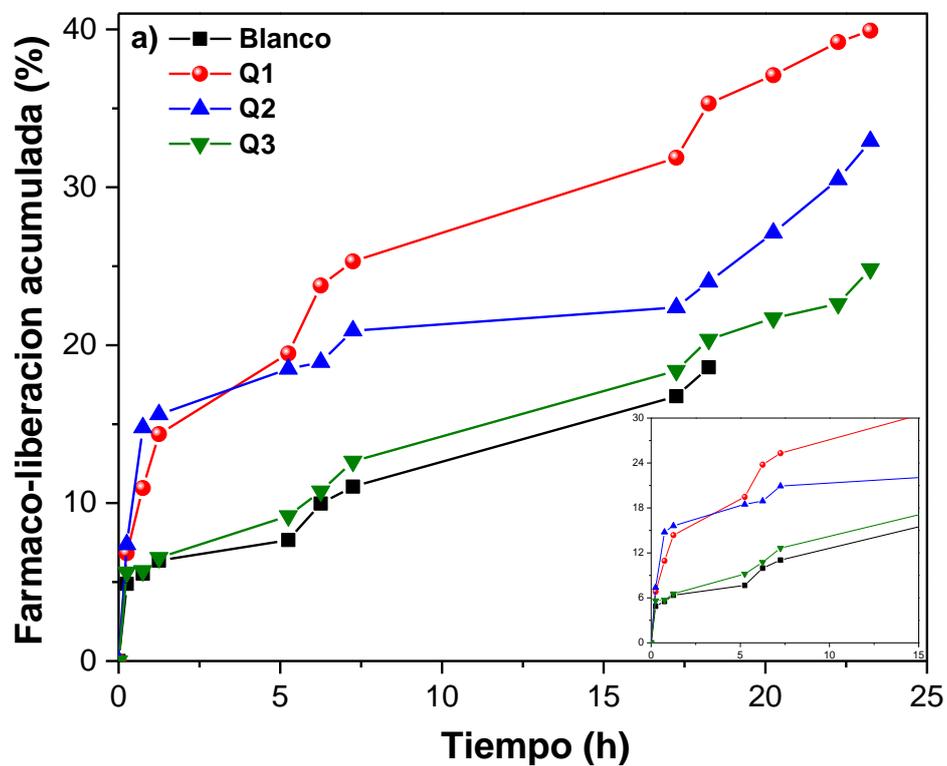
#### 4.6.2 Antioxidantes. CoQ10, Resveratrol y L-metionina.

La fármaco-liberación *in vitro* a partir de las formulaciones preparadas se realizó por el método de diálisis con solución amortiguadora de PBS como medio de liberación igual que en las muestras anteriores y los resultados son presentados en la Figura 21.

El ingrediente activo farmacéutico CoQ10, el cual corresponde a la formulación de Q1 = P1 + CoQ10, es el que presentó el mejor tiempo de liberación prolongada de acuerdo a su perfil de liberación con un valor de aproximadamente 40% en 24 h en porcentaje de fármaco-liberación acumulada, en comparación del blanco y de las demás formulaciones preparadas. Q2 presentó una liberación de CoQ10 de aproximadamente 33%, seguida de Q3 con una liberación del 25% en un tiempo final de 24 h. Asimismo, el fármaco puro (blanco) sólo atraviesa la membrana de diálisis a un máximo del 18% en el medio de PBS durante 18 h. Los nanogeles utilizados para la liberación de CoQ10 demostraron que la liberación es relativamente constante a excepción de tres aumentos notorios en la concentración en los tiempos de 1 h, 6 h y 18 h siendo los más evidentes para Q1 y los menos perceptibles para Q3, lo que presenta una liberación más controlada, a estos aumentos es a lo que generalmente se le denomina el efecto *burst*.

El perfil de liberación del Resveratrol se muestra en la Figura 21 (b). Las muestras R1 y R2 mostraron un patrón de liberación similar con un 43% durante 56 h. De igual manera, es importante mencionar que R2 en la última hora de la liberación, presentó un pico que aumentó la concentración de 38% a 43%. Por el contrario, R3 mostró una liberación más lenta y gradual del fármaco con una concentración final de 36% a las 56 h, presentando ligeros cambios a aproximadamente en 45 h. Al contrario, el blanco sólo

alcanza una concentración acumulativa de 32% en 34 h, ligeramente por debajo de los valores de R1 y R2 con un 31%. Los nanogeles preparados mostraron un aumento en la liberación de 12% de Resveratrol más que el blanco en aproximadamente el doble de tiempo.



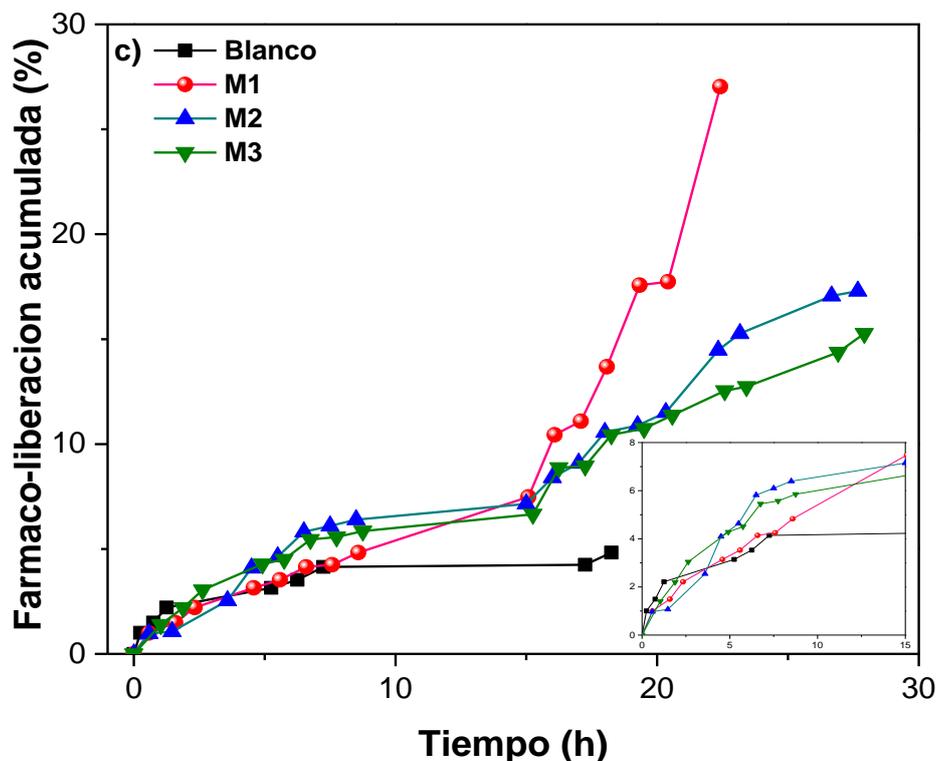


Figura 21. Perfiles de liberación de fármaco de los sistemas poliméricos cargados con: (a) CoQ10, (b) Resveratrol, (c) L-Metionina. Recuadros: las primeras 15 h de liberación.

Los resultados de los perfiles de liberación de la L-Metionina de las formulaciones preparadas se muestran en la Figura 21 (c), en la cual se puede apreciar que M1 fue el mejor sistema polimérico, seguido de M2 y M3, con liberación acumulada del principio activo del 27%, 17% y 15% respectivamente, en un tiempo de ~27 h al término de la liberación. Se puede apreciar que tanto el sistema M2 y M3 tienen mucha similitud en cuanto al comportamiento de liberación del principio activo del blanco. En cambio para M1 el comportamiento de la liberación fue similar a M2 y M3 hasta las 15 h para después dar una notable liberación ligeramente escalonada hasta alcanzar el 27%.

Todos los sistemas ofrecieron una liberación constante y con mayor ingrediente activo farmacéutico liberado que la referencia (fármaco libre de sistema polimérico). El blanco solo alcanzó un 4.5% en 18 h aproximadamente.

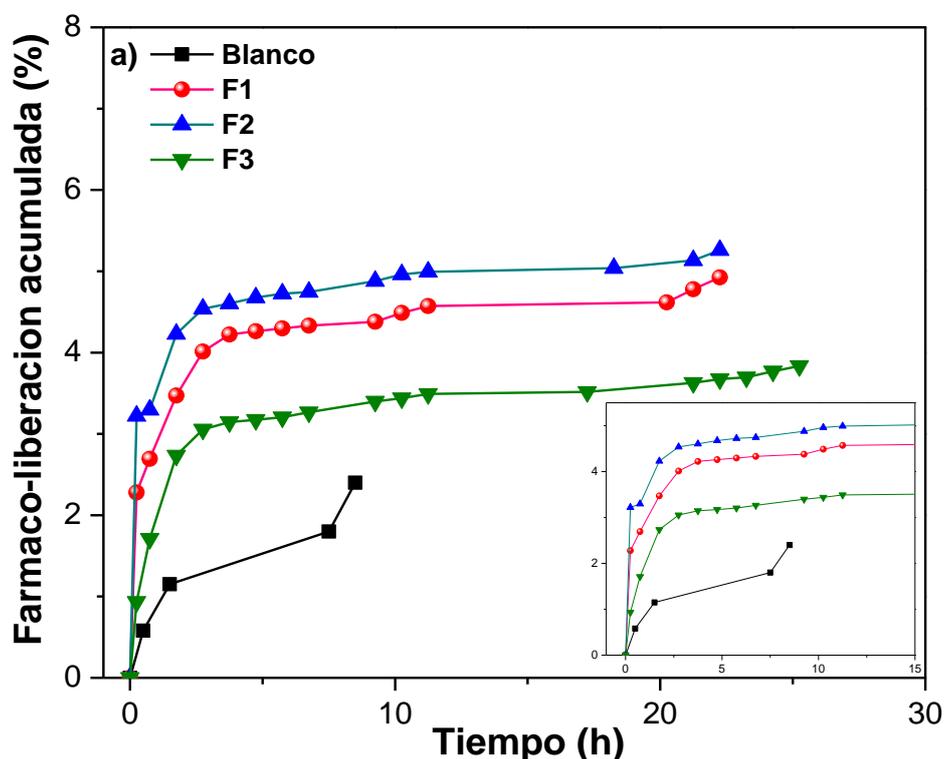
De lo anterior es evidente que Q1 fue la mejor formulación preparada para la CoQ10 con un ~5% de la muestra más cercana. Con respecto al Resveratrol, R2 resultó ser la mejor formulación con un ~2% por arriba de la muestra más cercana durante todo el tiempo de liberación. Para L-Metionina, M1 fue la mejor formulación con un efecto *burst* muy evidente a 15h de ~16% con respecto a M2 y M3. Durante ese periodo de tiempo de 15h la liberación de M2 y M3 fue mejor que M1. Puede asegurarse que nuestra

propuesta solamente resultó mejor que la base polimérica en el caso del Resveratrol. Con respecto a la referencia o blanco, esto es, al principio activo solo, todas las formulaciones preparadas fueron mejores.

#### 4.6.3 Fármacos para el tratamiento de CBC. Imiquimod y 5-FU

La evaluación de la liberación *in vitro* del fármaco atrapado en la formulación preparada es uno de los parámetros principales para obtener una indicación de cuál será su comportamiento *in vivo*. El comportamiento de liberación de diferentes formulaciones se exploró durante un período de 25 h para 5-FU y 55 h para Imiquimod por el método de membrana de diálisis. Los patrones de liberación de las formulaciones se exhiben en la Figura 22. En estos gráficos el blanco, al igual que en las anteriores figuras de liberación *in vitro*, representa la liberación del principio activo sólo, sin soporte.

Los resultados de la liberación de 5-FU se muestran en la Figura 22 (a) que presenta una liberación casi constante de 3 a 22 h para todos los sistemas formulados. La liberación se terminó a las ~25 h, los sistemas presentaron porcentajes aproximados de 4.9, 5.3 y 3.8% en F1, F2 y F3, respectivamente. Hay dos motivos posibles: en primer lugar, el núcleo hidrofóbico de las partículas poliméricas interactúa fuertemente con el 5-FU; en segundo, el proceso de disolución lenta de 5-FU en PBS a pH 7.4 podría atribuirse a la hidrofobicidad característica de los fármacos.



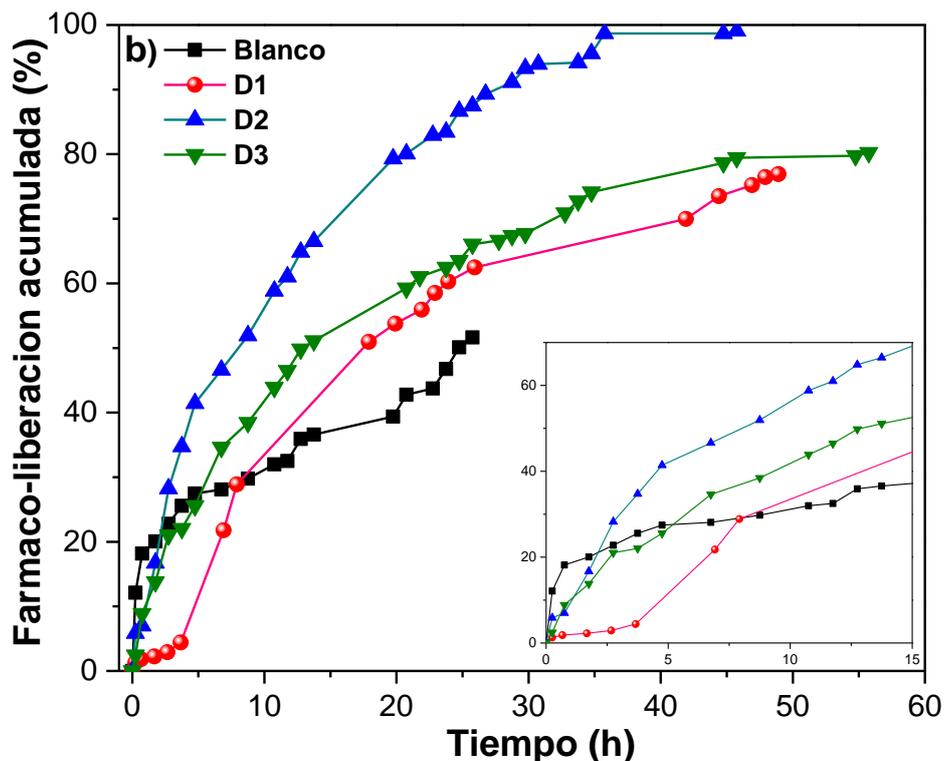


Figura 22. Perfiles de liberación de fármaco de los sistemas poliméricos cargados con: (a) 5-FU y (b) Imiquimod. Recuadros: las primeras 15 h de liberación.

Por otro lado, la Figura 22 (b) muestra una forma de liberación continua hasta las 25 h. La mitad de la cantidad del fármaco se liberó en ese periodo de tiempo. La gráfica del porcentaje de liberación del principio activo solo presentó una liberación inicial de ráfaga seguido por una meseta durante la segunda fase del perfil cinético, como se muestra en la Figura 22 (b). En general, D2 libera un ~ 99% de Imiquimod a las 35-40 h mientras que D3 y D1 liberan entre un 80 y 77% de Imiquimod en el mismo periodo de tiempo. De todos los principios activos este es el que se libera casi en su totalidad.

Las formulaciones preparadas con carga de 5-FU e Imiquimod, presentaron una mayor afinidad por el Imiquimod que por el 5-FU. Esto puede verse en los perfiles de liberación que tienen mayor cantidad de liberación de Imiquimod en más tiempo.

Con base en los resultados presentados se puede afirmar que la tendencia de los sistemas poliméricos preparados en la fármaco-liberación muestra una liberación más sostenida y con mayor cantidad de ingrediente activo farmacéutico liberado para la mayoría de las formulaciones, en comparación a su contraparte la referencia o fármaco sólo (blanco), esto debido principalmente al tiempo de retención dentro de la nanosistema y al mecanismo de liberación del principio activo. Se puede suponer por ello, que la adición de PVP al sistema provoca una liberación más lenta y tiene un efecto en el

aumento de la capacidad de carga del fármaco. Posiblemente debido a que al aumento de capas en las nanopartículas retenga entre sus cadenas poliméricas parte del fármaco evitando que este salga en su totalidad del sistema polimérico y a su vez prologando el tiempo de salida mismo. A excepción de los sistemas Q2 y M2 en los que no se cumple esta suposición al ser los sistemas Q1 y M1 los que presentaron una liberación mayor y más sostenida.

En todas las figuras de perfiles de liberación se muestra que el sistema que presenta las características de una liberación rápida es el sistema P3, siendo la única excepción en el caso de D3 donde se demostró una liberación más sostenida, sistema que contiene un excedente de PEG en el sistema de P123 por sí solo. Esto pudo deberse al sobreentrecruzamiento con PEG del sistema P2 lo que desfavoreció la cantidad de ingredientes activos farmacéuticos atrapados en el núcleo de la micela, dejándolo probablemente en el área circundante al núcleo.

Del mismo modo, las formulaciones exhiben una liberación del principio activo más alta y sostenida que el blanco (fármaco puro). Se puede proponer que las formulaciones preparadas disminuirán las fluctuaciones del principio activo permitiendo así intervalos de dosificación más largos y aumentando la comodidad del paciente. Por otra parte, se ha encontrado que algunos ingredientes activos farmacéuticos interactúan más fuertemente con PVP que con PEG, debido a los átomos de oxígeno cargados parcialmente negativos, presente en el grupo amida de PVP. El PEG mostró un comportamiento similar, aunque menos marcado que el PVP [121]. Como bien se puede percibir, los sistemas con PVP tienen una mayor cantidad de liberación de fármacos que los que tienen PEG.

#### 4.7 Estudio por DLS y Potencial Zeta

Continuando con la caracterización de las preparaciones obtenidas, se utilizó la dispersión de luz dinámica para la determinación del diámetro hidrodinámico y por otro lado se utilizaron mediciones del potencial Zeta para determinar la estabilidad de los sistemas poliméricos que están en forma de suspensiones coloidales.

Las figuras de distribuciones de tamaño se presentan por porcentaje de intensidad, durante 26 h para el caso de los nanosistemas poliméricos, sin fármaco, dispersados en agua a temperatura ambiente. La Figura 23 muestra los resultados de DLS y los valores son exhibidos en la Tabla 8.

El encapsulamiento de ingredientes activos farmacéuticos en los sistemas tiene un efecto significativo sobre el tamaño de partícula y su distribución. El tamaño de la micela sin cargar (libre de fármaco) es preferible que sea lo suficientemente pequeño para facilitar su entrada dentro de las barreras biológicas y aumentar su tiempo de circulación en la sangre [122].

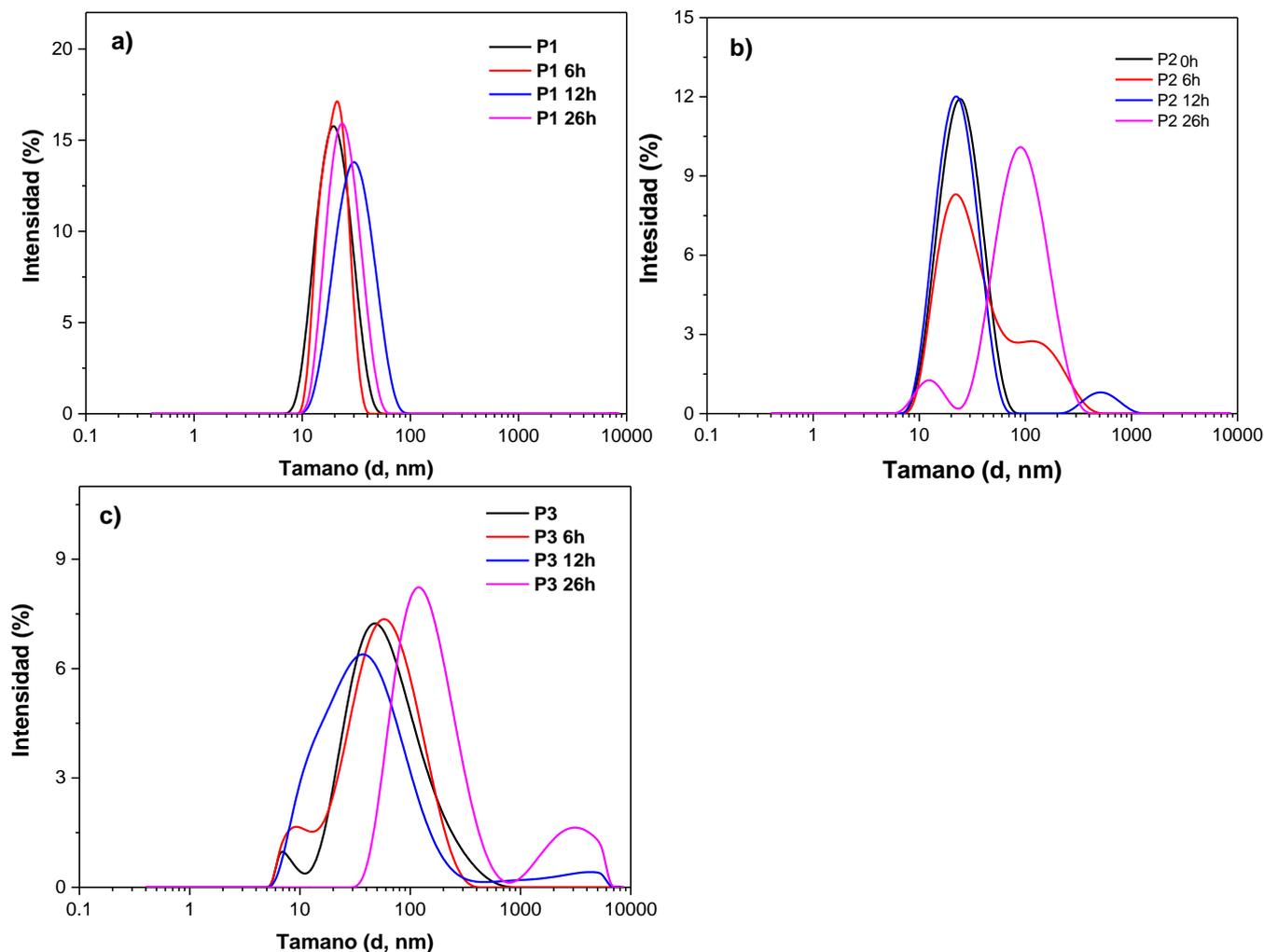


Figura 23. Perfiles de distribución de tamaño por DLS para los sistemas poliméricos sin fármaco en 26 h (a) P1, (b) P2 y (c) P3.

Los tamaños promedio de las formulaciones no cargadas y cargadas presentaron patrones de distribución de tamaño bastante amplios. En cuanto a la relación de tamaños de los sistemas poliméricos cargados es evidente que el tamaño aumenta un orden de magnitud en comparación con las partículas no cargadas, lo cual es esperado. Este aumento en el tamaño promedio es causado por el atrapamiento del fármaco en los sistemas poliméricos [66].

Los iones presentes en un líquido pueden ser cationes (carga positiva) y/o aniones (carga negativa). Cuando una partícula cargada se suspende en un líquido, iones de carga opuesta serán atraídos a la superficie de la partícula suspendida; dicho de otra forma, una muestra con carga negativa atrae a los iones positivos del líquido y por el contrario una muestra cargada positivamente atrae los iones negativos del líquido. Esta carga se puede medir por medio del mismo equipo utilizado para la determinación de la distribución de tamaños, DLS sólo que en este caso se medirá el potencial Zeta de cada muestra.

El potencial Zeta es la medida de interacción y estabilidad de los sistemas coloidales. En largos periodos de tiempo la estabilidad coloidal, por lo general, se observa en potenciales Zeta mayores a  $-30$  mV. La mayoría de las formulaciones preparadas mostraron carga negativa y fueron estables a temperatura ambiente, como se muestra en la Tabla 8. A excepción de F1 y F3 que presentaron un potencial Zeta de cero, lo que significa que tienen tendencia a aglomerarse. Lo anterior corrobora lo observado por HRTEM, en esas micrografías se observó aglomeración en F1 y F3.

Tabla 8. Tamaños y potencial Zeta para las muestras con y sin carga de fármaco

Sistema	Tamaño (nm)			Potencial Zeta (mV)		
	Sin carga (P)	Cargada con fármaco		Sin carga (P)	Cargada con fármaco	
		5-FU (F)	Imiquimod (I)		5-FU (F)	Imiquimod (I)
1	$20 \pm 5$	$1943 \pm 36$	$1421 \pm 89$	$-4.25 \pm 7$	$0 \pm 3$	$-49 \pm 0.45$
2	$25 \pm 10$	$1365 \pm 58$	$2698 \pm 45$	$-0.87 \pm 5$	$-40 \pm 8$	$-46 \pm 0.46$
3	$50 \pm 20$	$709 \pm 83$	$1309 \pm 60$	$-2.27 \pm 3$	$0 \pm 5$	$-41 \pm 0.41$

Los sistemas poliméricos sin fármaco presentaron valores cercanos a cero, con carga negativa de potencial Zeta entre  $-0.47$  mV y  $-4.25$  mV, explicándose la tendencia a aglomerarse de estos sistemas. El potencial Zeta de las micelas sin carga es casi neutro en comparación con las formulaciones preparadas que mostraron un potencial Zeta altamente negativo que expresa la estabilidad de la formulación; atribuyéndose, el cambio de carga de la superficie de las muestras cargadas resultado de la encapsulación del principio activo.

La agregación de partículas ocurre si el potencial Zeta de las mismas es demasiado bajo para proporcionar suficiente repulsión eléctrica o barreras estéricas entre sí, como es el caso de todas las muestras de los sistemas poliméricos P1, P2, P3, F1 y F3.

La liofilización de las muestras se sabe que aumenta el potencial Zeta de las partículas lo cual hace que el riesgo de agregación de las mismas disminuya. Un alto valor de potencial Zeta requiere una mayor energía para que se logre la unión de dos partículas cercanas, es decir, existe una gran barrera de energía entre las partículas, debido a lo cual, se presenta la estabilidad de las formulaciones preparadas [18 123].

#### 4.8 Bioensayos en *E. coli*

Los análisis de los bioensayos de los nanosistemas poliméricos sin carga, evaluadas en la bacteria *E. coli* con agar LB se muestran en las Figuras 24 (a) y (b), y en el caso del caldo LB se muestran en la Figura 24 (c). En ambos estudios, se realizaron blancos (pruebas sin los sistemas poliméricos) como control. Para la prueba con agar, las bacterias se incubaron durante 24 h. El estudio en caldo bacteriano se mantuvo durante 50 h y la supervivencia bacteriana se analizó usando un espectrofotómetro y calculando el número de células bacterianas bajo la relación  $OD_{600}$  de  $1.0 = 8 \times 10^8$  células/mL [124-126]. En el caso de los sistemas poliméricos con carga de fármaco, los resultados se muestran en las Figuras 25 y 26.

##### 4.8.1 Nanosistemas poliméricos sin carga de fármaco

En las fotografías de la Figura 24 (a) y (b), se puede ver el crecimiento bacteriano después del tiempo de incubación resultando similar en ambas cajas de Petri tanto en el blanco como en los nanosistemas poliméricos. Por otro lado, el crecimiento bacteriano después del tiempo de incubación en el bioensayo en caldo con las formulaciones y el blanco con solamente la bacteria se presenta en la Figura 24 (c).

En los sistemas poliméricos y el blanco (*E. coli* en ausencia de material polimérico) en la primera hora del bioensayo, se observó un crecimiento bacteriano casi igual para todos los sistemas, repitiéndose este evento a las 22 h donde una vez más tienen una concentración bacteriana similar. Le sigue un periodo constante hasta las 28 h, después de ese tiempo, las muestras P2 y P3 en medios de cultivo presentan un leve aumento del crecimiento bacteriano en comparación con el blanco, probablemente porque las bacterias se están alimentando de los componentes poliméricos. Al final del ensayo, a las 50 h, P1 mostró una inhibición de 9%, en contraparte de P2 y P3 que mostraron una proliferación mayor al blanco con un 10% y 16% respectivamente, lo cual puede ser debido a que las

bacterias exhiben cierta predilección por el material PVP más que por el PEG. Más estudios deben llevarse a cabo para afirmar estas suposiciones.

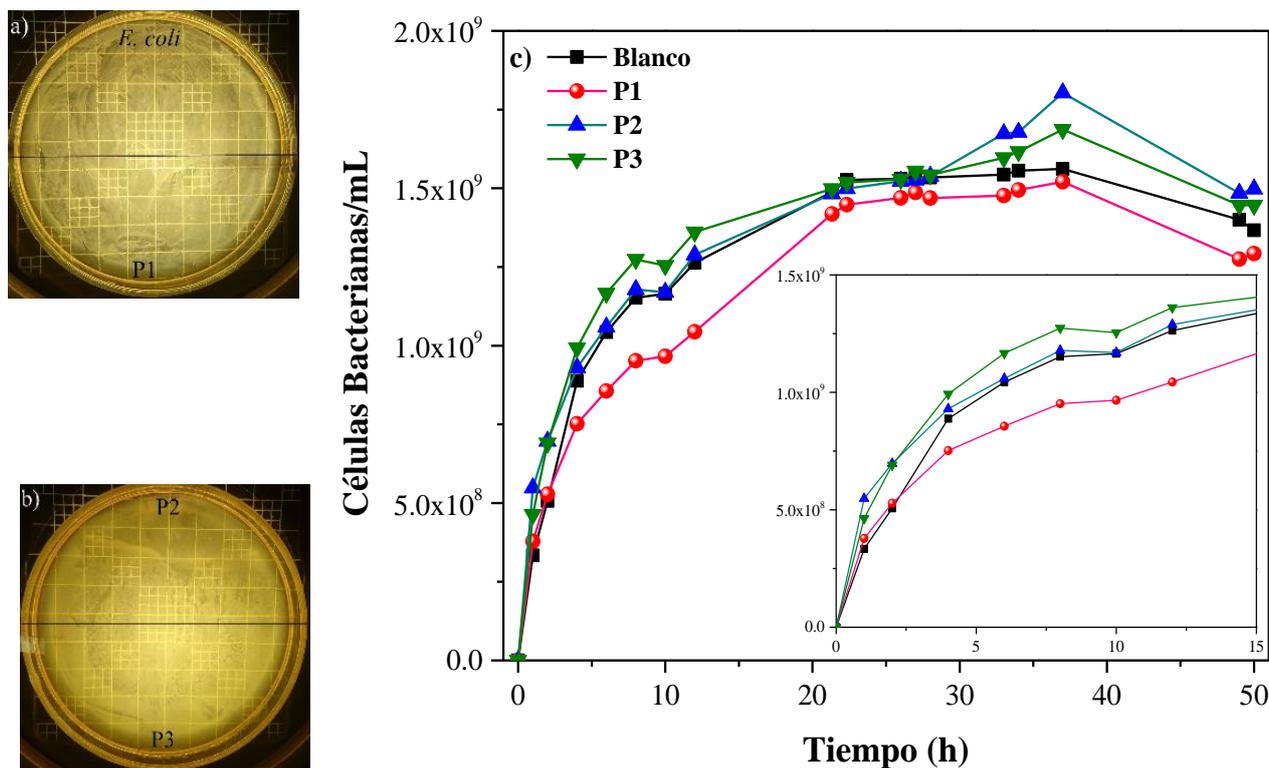


Figura 24. Bioensayos de sistemas poliméricos libres de fármaco en *E. coli* fotografías de los medios en Agar para: (a) blanco y P1 (b) P2 y P3. (c) Perfiles de fármaco-liberación Recuadro: las primeras 15 h de incubación.

#### 4.8.2 Sistemas poliméricos cargados de fármaco

Estos estudios se realizaron intentando conocer la interacción bacteria-sistema polimérico-fármaco, así como la demostración de que durante el proceso de cargado no se afectó la funcionalidad de los ingredientes activos farmacéuticos.

##### 4.8.2.1 CoQ10 y Resveratrol

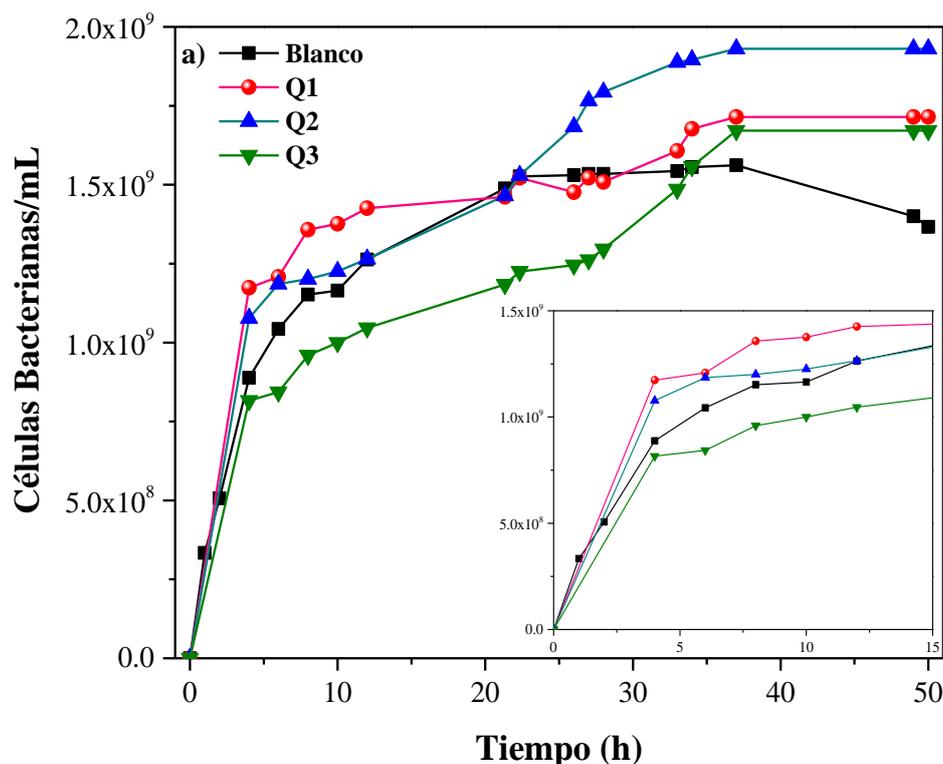
Los bioensayos con *E. coli* se llevaron a cabo con dosis de 1 mg de partículas poliméricas cargadas con principio activo por mL de solución y los resultados se presentan en la Figura 25 (a) y (b) para CoQ10 y Reveratrol respectivamente.

Durante el estudio de los tres nanosistemas poliméricos, en las primeras 4 h las formulaciones preparadas Q1 y Q2 mostraron crecimiento bacteriano por encima del blanco. La formulación Q1 exhibió un desarrollo bacteriano más alto de los tres sistemas

en comparación con el blanco entre 0-20 h, para finalmente terminar a las 50 h con un crecimiento de aproximadamente 25% superior al blanco. El sistema Q2 presentó una liberación más prolongada del principio activo con el aumento de crecimiento bacteriano más alto que las otras dos formulaciones preparadas; siendo el crecimiento bacteriano cerca del 40% mayor que el blanco. El crecimiento con Q3 se mantuvo debajo del blanco durante 33 h, presentando a las 34 h un impulso en la proliferación bacteriana para después permanecer con aproximadamente el 22% del crecimiento bacteriano a las 50 h.

El Resveratrol presentó actividad bacteriostática (inhibiendo el crecimiento de *E. coli*) a dosis de 1 mg/mL como se muestra en la Figura 25 (b). Todos los sistemas cargados presentan un efecto bacteriostático muy similar desde su inicio hasta las 22 h. Los sistemas R2 y R3 mostraron una proliferación bacteriana mucho mayor que el blanco la cual comenzó a las 26 h prolongándose hasta las 50 h. El R1 mostró un comportamiento similar al blanco después de 37 h, en contraste a R2 y R3.

Al final de las 50 h los sistemas R1, R2 y R3 mostraron un aumento con respecto al blanco de 1, 4 y 3% respectivamente.



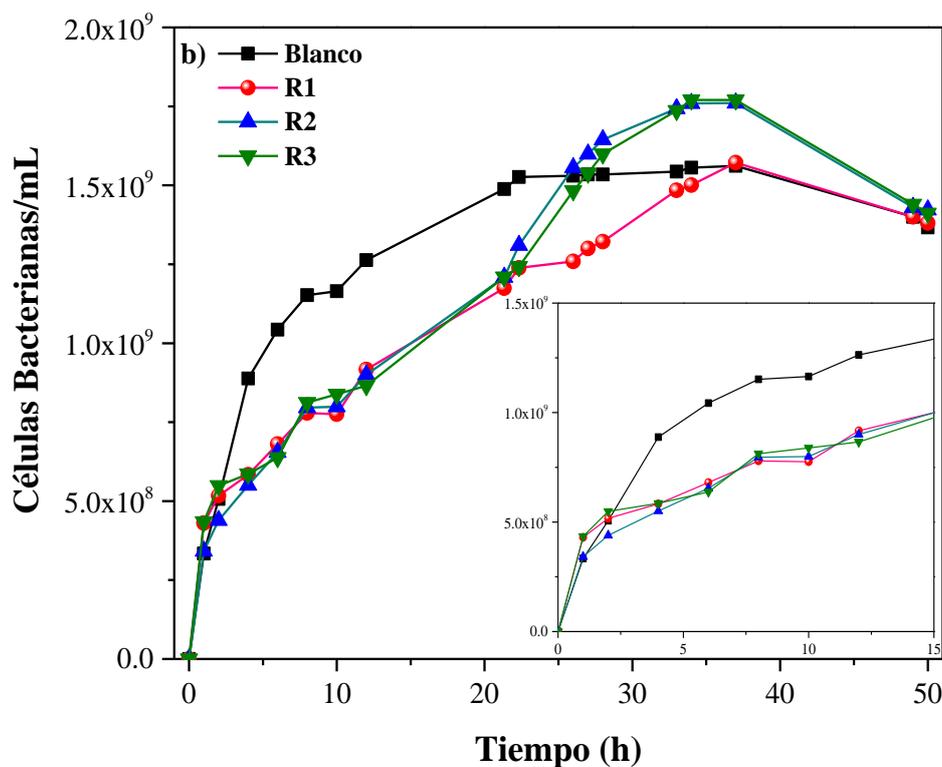


Figura 25. Bioensayo de fármaco-liberación en bacterias *E. coli* de los sistemas poliméricos cargados con: (a) CoQ10 y (b) Resveratrol. Cuadros: las primeras 15 h de la incubación.

#### 4.8.2.2 Imiquimod y 5-FU

La liberación *in vitro* del fármaco desde la formulación polimérica en caldo LB en *E. coli* a temperatura de la piel se muestra en la Figura 26. En la Figura 26 (a) se revela que las tres formulaciones micelares mostraron un comportamiento similar hasta las 35 h. La mayor inhibición bacteriana se presentó a las 21 h con aproximadamente un 67%. Los porcentajes aproximados de inhibición fueron mejores para F3 con 27%, seguido de F1 con 25% y F2 con 19%, este último perdiendo ligeramente su eficacia observándose un aumento de la proliferación bacteriana al final de las 50 h.

La Figura 26 (b) muestra que, antes de las 28 h las formulaciones preparadas presentan una inhibición bacteriana muy similar, siendo D3 el que pierde primero su eficacia, posiblemente debido a la menor liberación del principio activo encapsulado. El siguiente cambio se produce a las 33 h, en los sistemas D1 y D3 probablemente debido a que disminuye la liberación del fármaco y hay crecimiento bacteriano. Al final del bioensayo, las formulaciones preparadas mostraron un aumento en la proliferación bacteriana, con el orden descendente siguiente,  $D3 > D1 > D2$ , con un porcentaje de aproximadamente el 74%, 54% y 17%, respectivamente. Los bioensayos que incluyeron

los fármacos 5-FU e Imiquimod mostraron que sus propiedades bacteriostáticas no fueron disminuidas al ser cargados en los sistemas poliméricos puesto que inhibieron el crecimiento bacteriano.

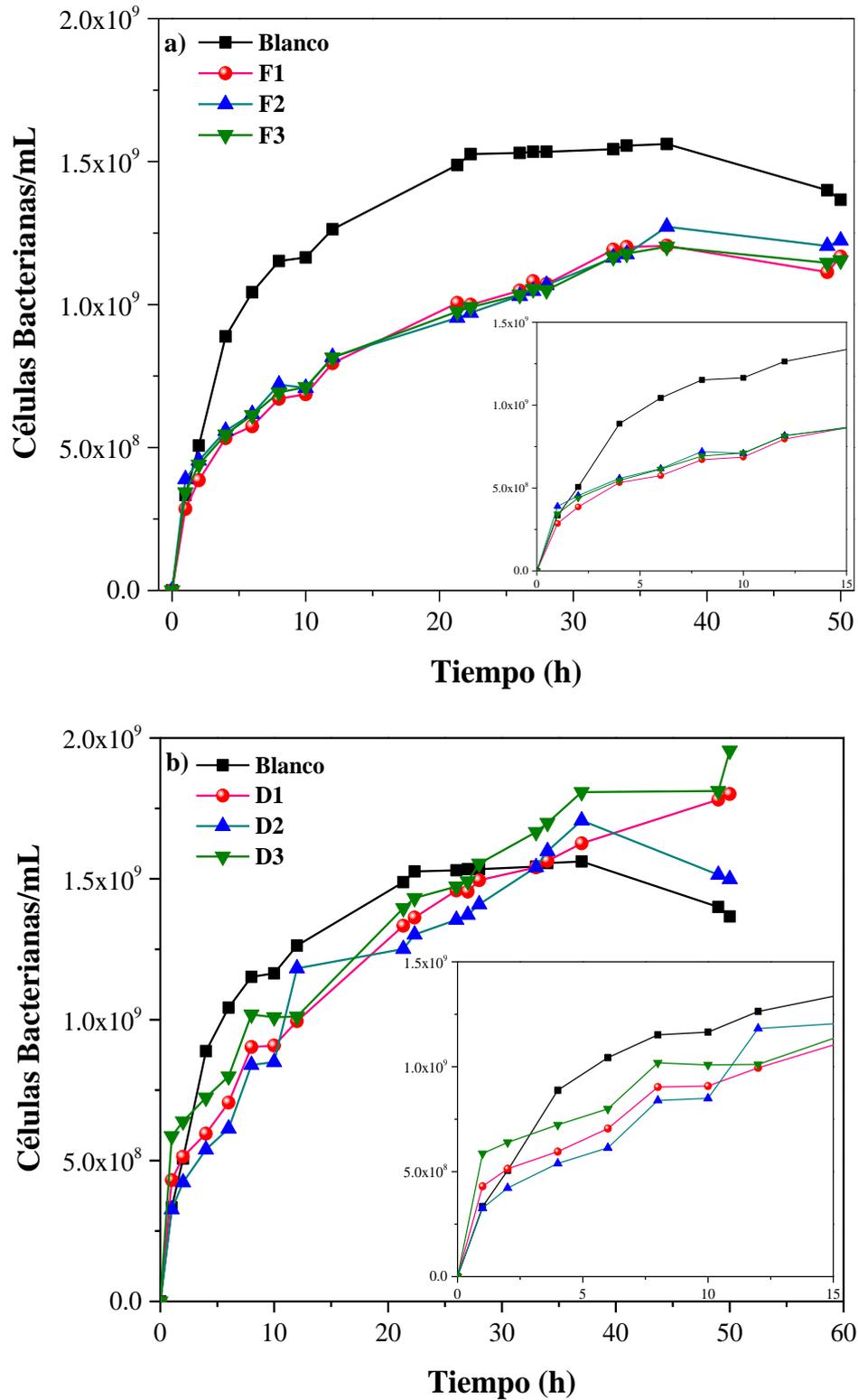


Figura 26. Bioensayo de fármaco-liberación en bacterias *E. coli* de los sistemas poliméricos cargados con: (a) 5-FU y (b) Imiquimod Recuadros: las primeras 15 h de la incubación.

Los resultados indicaron que los sistemas poliméricos mostraron la propiedad de liberación sostenida para el principio activo encapsulado. El mecanismo de liberación de los ingredientes activos farmacéuticos a partir de los sistemas está relacionado con la difusión del fármaco, las erosiones en los materiales poliméricos o la expansión de los mismos [127]. Conforme a la clasificación de la solubilidad de los fármacos y mecanismos de velocidad de liberación de Andreetta, él declara que para los fármacos parcialmente solubles (entre 0.5 y 5 mg/mL) como la mayoría de los principios activos en este estudio, estos presentan un comportamiento intermedio entre la hinchazón y la erosión del núcleo micelar. En otras palabras, la velocidad de liberación dependerá de la velocidad de infiltración e hinchamiento de la matriz y por el otro de la velocidad de erosión del núcleo micelar. En cambio para el 5-FU, único fármaco pobremente soluble (< 0.5 mg/mL) y el que presentó la menor liberación de fármaco de todas las formulaciones desarrolladas en este estudio, la liberación dependió de la erosión del núcleo, ya que el PBS que penetra e hincha el polímero no alcanza para solubilizar el principio activo. El cual, se solubilizó en el medio después de la ruptura del núcleo consistiendo la velocidad de disolución dependiente principalmente de las características de solubilidad del fármaco tales como, el estado cristalino, ionicidad y tamaño de partícula [128]. Para comprobar lo anterior, sería conveniente solubilizar el 5-FU en otro solvente que no sea etanol y seguir el mismo procedimiento de cargado, en las mismas muestras o cambiar el sistema base que es el P123.

Del mismo modo, se observó que para los sistemas poliméricos libres de fármaco presentaron un crecimiento similar al blanco de *E. coli* sin polímero y como era de esperarse, el comportamiento de las formulaciones preparadas desarrollaron la actividad correspondiente para cada principio activo, tales como inhibición del crecimiento bacteriano con sistemas cargados con 5-FU, Resveratrol, Imiquimod y CoQ10 en el siguiente orden decreciente, 5-FU>Resveratrol>Imiquimod>CoQ10. Para los sistemas cargados con Resveratrol y CoQ10 se conjeturaba un aumento en la proliferación bacteriana por su naturaleza antioxidante, aunque estos presentaron en menor grado, una inhibición del desarrollo bacteriano. En la mayoría de los casos el sistema polimérico P2 exhibió un aumento en el conteo de células bacterianas en relación a los otros dos sistemas P1 y P3 a excepción del sistema D3, donde en esta muestra cargada con Imiquimod (P3) se percibió el mayor aumento bacteriano. Los comportamientos en los bioensayos con los sistemas poliméricos fue muy similar a los obtenidos en los perfiles de fármaco-liberación, concluyéndose que los sistemas poliméricos no afectaron el desarrollo

bacteriano esto es, son relativamente inertes, incluso estos resultados de los nanosistemas poliméricos preparados muestran que mejoraron en ese sentido al sistema base, esto es, disminuyeron el efecto inhibitor del sistema base, además de que los métodos de encapsulamiento de los fármacos no afectó la funcionalidad de los mismos.

#### 4.9 Estabilidad de suspensiones

Para evaluar la estabilidad de la dispersión y fenómenos de aglomeración de las partículas preparadas en medio acuoso, se investigó el comportamiento de sedimentación dependiente del tiempo por medio de mediciones del perfil de transmisión mediante el equipo TurbiscanLab®. Los perfiles de transmisión fueron tomados cada 30 minutos durante 50 ciclos, siendo el medio de suspensión agua. En la Figura 27 se puede observar que las curvas correspondientes a los sistemas poliméricos sin cargar muestran un pico evidente entre 34 a 35 mm, lo que indica una formación de crema<sup>18</sup>, por otro lado, en la parte central no se logra apreciar gran variación en las señales, demostrando estabilidad en las suspensiones.

Los perfiles muestran un pico en la parte inferior del tubo típico de la migración de partículas pequeñas, entre 0 y 2 mm. Un gran aumento en T (%) en la parte superior del tubo sugiere la migración de los agregados/floculados. En seguida, se observó un ligero descenso de la señal al inicio de la medición durante el experimento que puede explicarse por el crecimiento de partículas floculadas inducidas como se muestra en la Figura 28 (a) que corresponden a los sistemas poliméricos con Resveratrol y más sutilmente en Figura 29 (c). Las Figura 28 (b) y (c) presentaron dispersiones estables sin ninguna aclaración o sedimentación de partículas.

Los perfiles correspondientes a los sistemas cargados de 5-FU, se muestran en la Figura 29, presentando un pico en la parte inferior del tubo típico de la migración de partículas pequeñas, al igual que las muestras anteriores. Igualmente, se observa aumento de la transmisión en la parte superior del tubo que sugirió la migración de los agregados/floculados. Este comportamiento se puede asociar a la coalescencia o floculación.

La estabilidad de las suspensiones preparadas se revisaron una semana después de la preparación, los perfiles de transmisión se tomaron de igual forma, cada 30 min durante 50 ciclos en agua como medio de suspensión. Se encontró que la intensidad de la

---

<sup>18</sup> Crema: formación de un líquido espeso y homogéneo en agua.

transmisión disminuye en la parte superior de la muestra debido a la clarificación y una ligera sedimentación en la parte media de la muestra, como se muestra en todas las Figuras 30 (a), (b) y (c) correspondientes a los sistemas poliméricos cargados con Imiquimod. En los perfiles anteriores, mostrados en las Figuras 28 y 29, se observó una dispersión muy estable de las partículas recién preparadas y caracterizadas, sin evidencia de aclaración o sedimentación alguna. Por el contrario, se observó una ligera caída progresiva de la señal en función del tiempo, en la región media del tubo con nanopartículas poliméricas después de almacenadas, esto puede explicarse por el crecimiento de partículas de floculación inducida como se muestra en la Figura 30 debido al tiempo de almacenamiento o cambios de temperatura durante el periodo de almacenamiento y análisis.

Como quedó demostrado en estos estudios, la estabilidad de las dispersiones en las formulaciones preparadas fue excelente para los objetivos que se persiguen. Todos los sistemas en suspensión mostraron estabilidad sobresaliente, lo que coincide muy bien con los altos valores de carga superficial obtenidos por el potencial Zeta, que predijeron que no debería haber aglomeración en sistemas cargados y por consiguiente ligera o nula sedimentación.

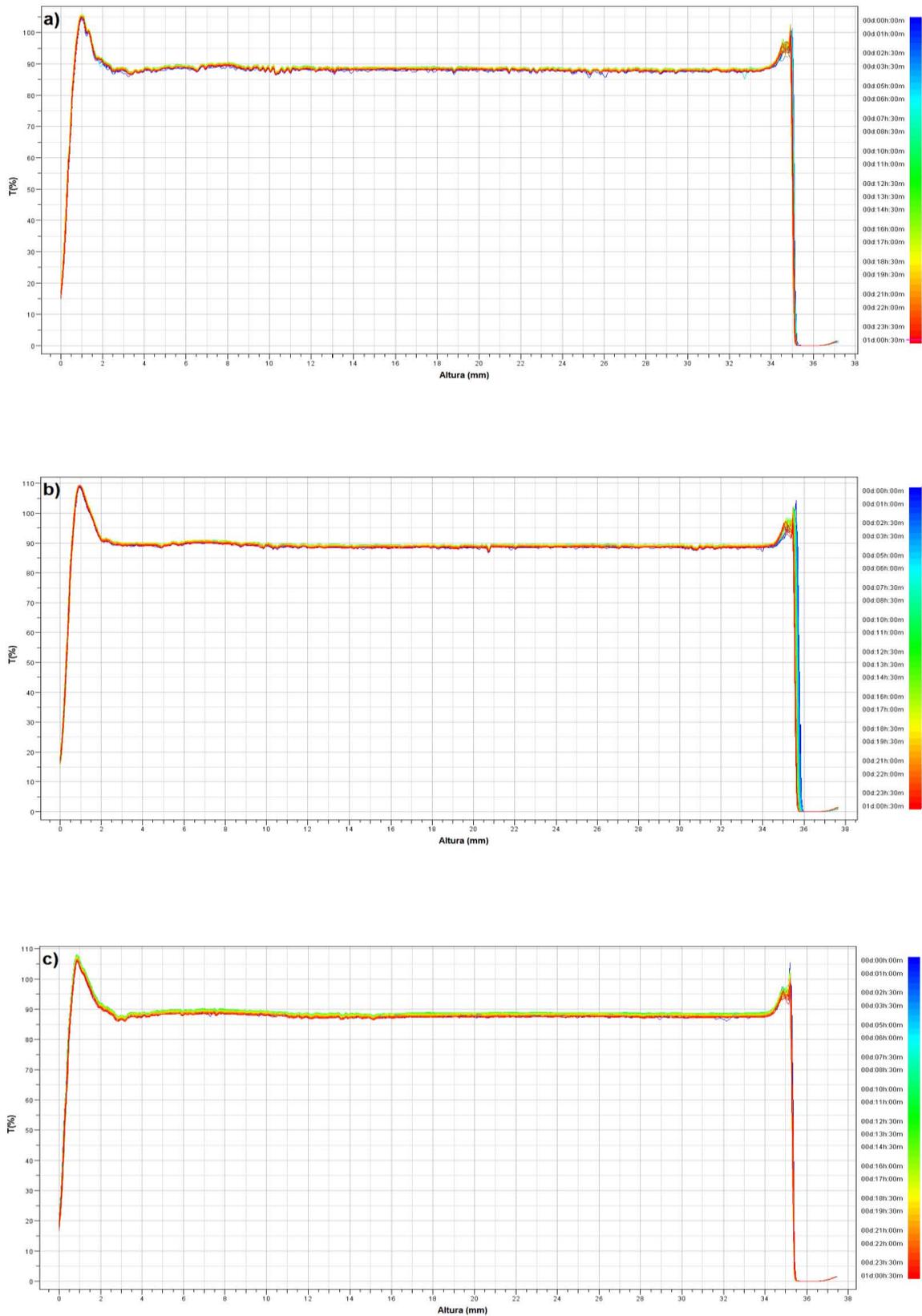


Figura 27. Perfiles de transmisión para (a) P1, (b) P2, y (c) P3 en agua a 25 °C.

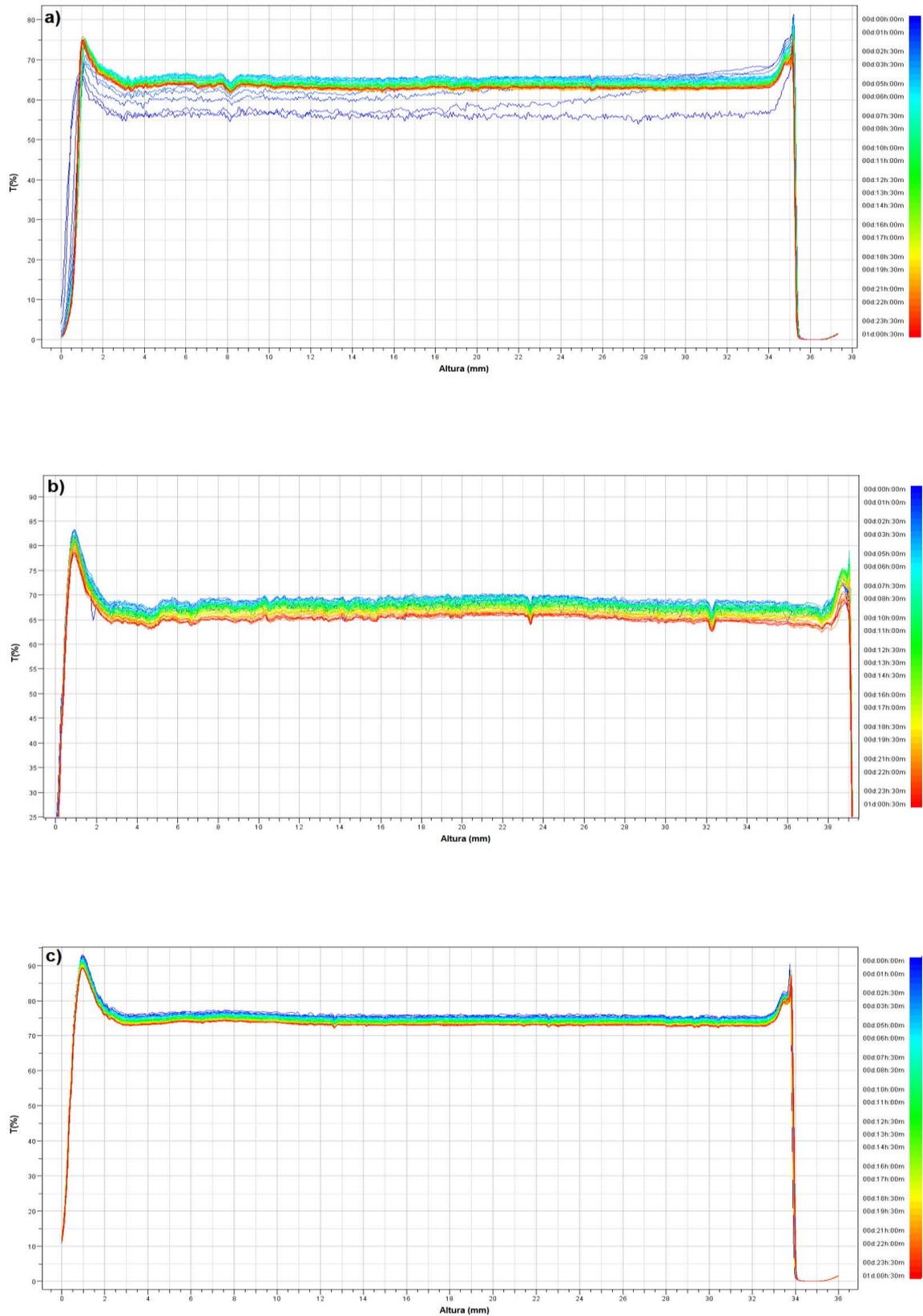


Figura 28. Perfiles de transmisión para (a) R1, (b) R2, y (c) R3 en agua a 25 °C.

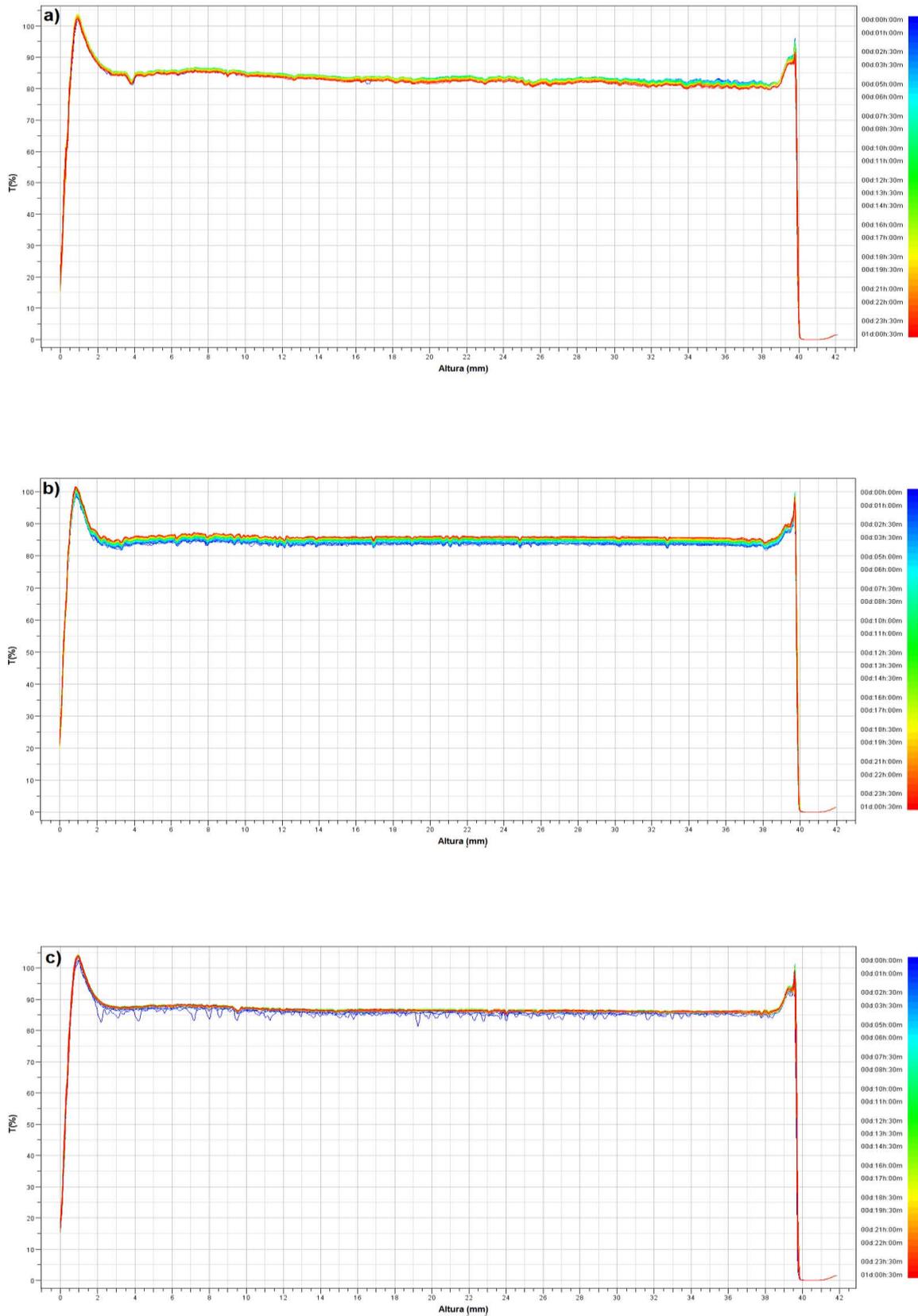


Figura 29. Perfiles de transmisión para (a) F1, (b) F2, y (c) F3 en agua a 25 °C.

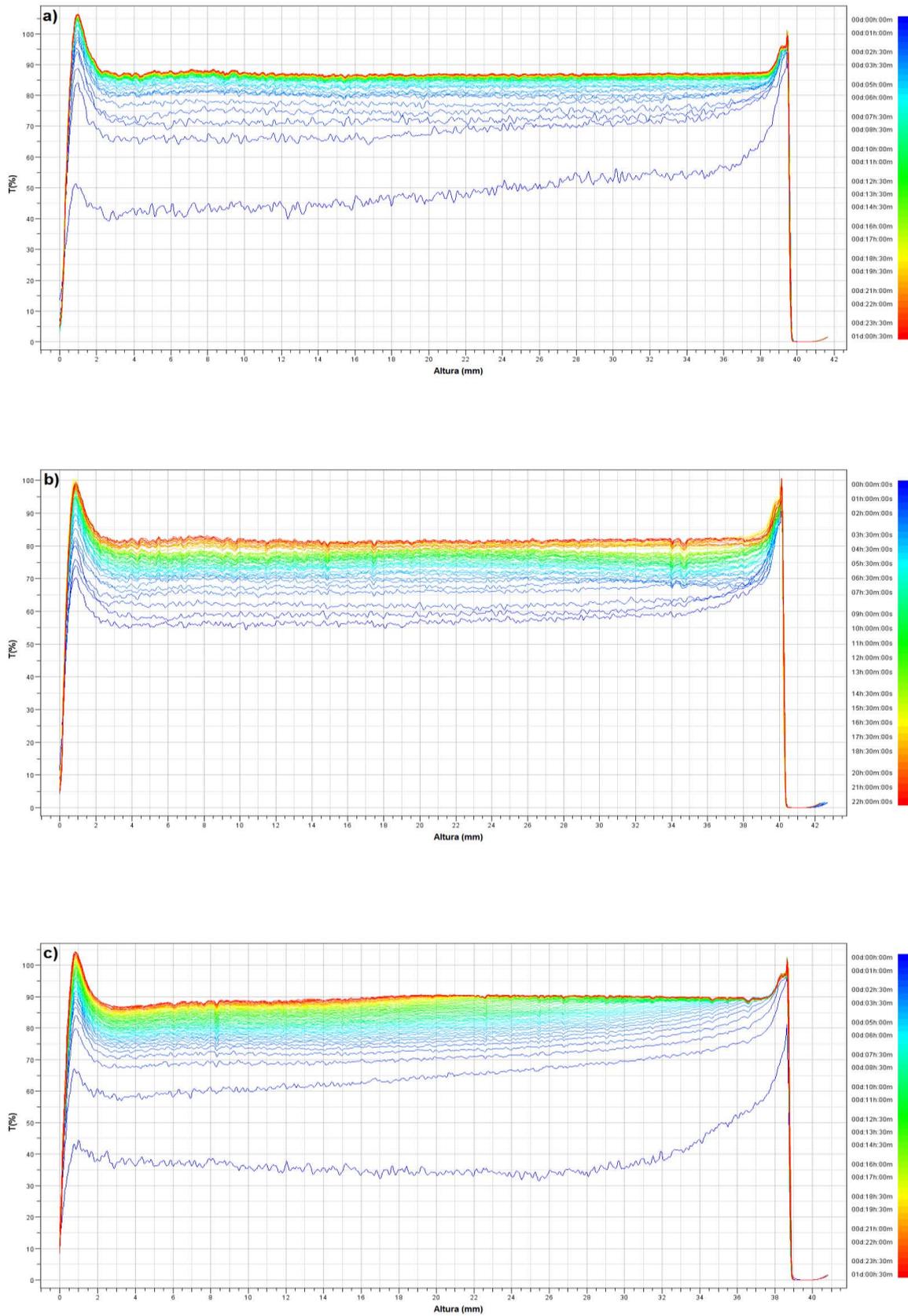


Figura 30. Perfiles de transmisión para (a) D1, (b) D2, y (c) D3 en agua a 25 °C.

## CAPÍTULO V. Conclusiones

Cada vez son más necesarios los sistemas biocompatibles de liberación de ingredientes activos farmacéuticos, partiendo de esta finalidad surgió el interés de este estudio a partir de un material comercial, la micela polimérica Pluronic® P123, que ya ha sido manejada para estas aplicaciones.

Tomando como base este material fue posible desarrollar nanosistemas poliméricos de Pluronic® P123 adicionado con PVP y PEG formando mezclas entrecruzadas físicamente. Las formulaciones preparadas fueron hechas por un método puramente físico, la temperatura utilizada no rebasó los 100 °C en ninguna etapa del proceso. Se seleccionaron dos sistemas, P2 y P3 además del sistema base P1. El material preparado se caracterizó por varias técnicas y los resultados de SEM y HRTEM mostraron una morfología esférica y tamaño nanométrico, lo anterior corroborado por DLS como se observó tanto en las micrografías como en los perfiles de distribución de tamaño.

Los nanosistemas preparados encapsularon de manera exitosa, principios activos hidrófobos (fármacos y antioxidantes), por medio del método de cargado por difusión con liofilización. La Indometacina que es un antiinflamatorio y una molécula modelo por su gran estabilidad y manejabilidad dio la pauta para continuar con los estudios con los demás principios activos que fueron L-Metionina, Resveratrol, Coenzima Q10, 5-fluorouracilo e Imiquimod. Las formulaciones preparadas fueron caracterizadas y los resultados de SEM y HRTEM mostraron una morfología semi-esférica similar a la de los materiales sin carga y tamaños micrométricos, lo anterior se corroboró por DLS con los perfiles de distribución de tamaño.

La estabilidad de las dispersiones en las formulaciones preparadas fue excelente para los fines que se persiguen. La mayoría de los sistemas en suspensión mostraron estabilidad sobresaliente, lo que coincidió con los altos valores de carga superficial obtenidos por el potencial Zeta, que predijeron que no debería haber aglomeración de los sistemas cargados y pudiera presentarse sedimentación leve, a excepción de los sistemas sin cargar, F1 y F3 los cuales presentaron valores negativos cercanos a cero de carga superficial.

Los perfiles de liberación de los diferentes ingredientes activos farmacéuticos incubados en los sistemas vía *in vitro* en condiciones cutáneas de temperatura, pH y solución amortiguadora, demostraron que las formulaciones poliméricas preparadas fueron capaces de encapsular y liberar de manera sostenida, por más de 8 h, a una

concentración 10:1 de polímero/fármaco. Al compararse los distintos perfiles de liberación de ingredientes activos farmacéuticos los sistemas P2 cargados presentaron una liberación prolongada para la mayoría de los principios activos hidrófobos, a excepción de los sistemas Q1 y M1, en ellos el mejor sistema adaptado fue la base micelar P1. Reafirmando entonces que la preparación del sistema P2, que contiene PVP en las formulaciones preparadas, logró una liberación del fármaco en un tiempo más prolongado y en mayor cantidad. Con la adición de PEG en la formulación denominada P3, dio como resultado en la liberación del principio activo más rápido y en menos cantidad. Del análisis de los resultados también puede afirmarse que entre mayor sea el recubrimiento de la base con mezclas poliméricas de PVP y PEG, menor es el tiempo de liberación, contrario a lo que se especulaba.

En este estudio *in vitro*, el suministro de los principios activos a condiciones de pH y temperatura cutáneos fue exitosa puesto que hubo liberación prolongada de los sistemas poliméricos, por lo que se plantea su potencial uso en la piel, también se puede suponer que aumentará la biodisponibilidad del fármaco.

De acuerdo a las características requeridas, se pueden diseñar las formulaciones adecuadas para la administración de ingredientes activos farmacéuticos en función de los requisitos de la aplicación (por ejemplo, tiempo de liberación y la exposición al sol). Sobre la base de mismas condiciones, los sistemas podrían utilizarse para: (i) P1, una liberación moderada; (ii) P2 para liberación prolongada, y (iii) P3, para una liberación rápida.

Los nanosistemas poliméricos preparados en este estudio para la administración de ingredientes activos farmacéuticos demostraron ser componentes biológicamente no perjudiciales en los pruebas primarias de bioensayos con *E. coli* para los sistemas sin carga de fármaco, que protegen al medicamento de la degradación, prolongan la exposición y que pueden mejorar el transporte de fármacos hacia las células; esto manifestado por la efectividad de los sistemas poliméricos cargados al exhibir el mismo patrón obtenido en los perfiles de fármaco-liberación.

En el caso de administraciones locales, los nanosistemas poliméricos con principios activos farmacéuticos aquí estudiados, tienen la posibilidad de aumentar la concentración de estos principios activos en el lugar de acción, lo que puede ser muy útil reduciendo el número de administraciones y cantidad de fármaco administrado.

Basándose en estos resultados, se concluye que las formulaciones preparadas y caracterizadas en este estudio pueden ser consideradas como sistemas de administración

de ingredientes activos farmacéuticos prometedores para cada fármaco-modelo estudiado. Las formulaciones aquí desarrolladas presentan varias ventajas, una de ellas es la sencilla preparación de los nanosistemas poliméricos, así como también el encapsulado de fármacos permitiendo la fabricación a gran escala por sus condiciones estándar.

## ANEXOS

## A.1 Estudio FT-IR para los sistemas poliméricos cargados con Indometacina

Los espectros FTIR se escanearon usando un espectrómetro IR Spectrum Two usando una resolución de  $0.5\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros se adquirieron usando UVW en la versión 6.0 del LabSoftware. Para cada espectro, se registró un promedio de 5 mediciones en el intervalo de longitud de onda 450–4000 nm. Después de cada medición, se tomó un nuevo espectro de fondo de aire como referencia.

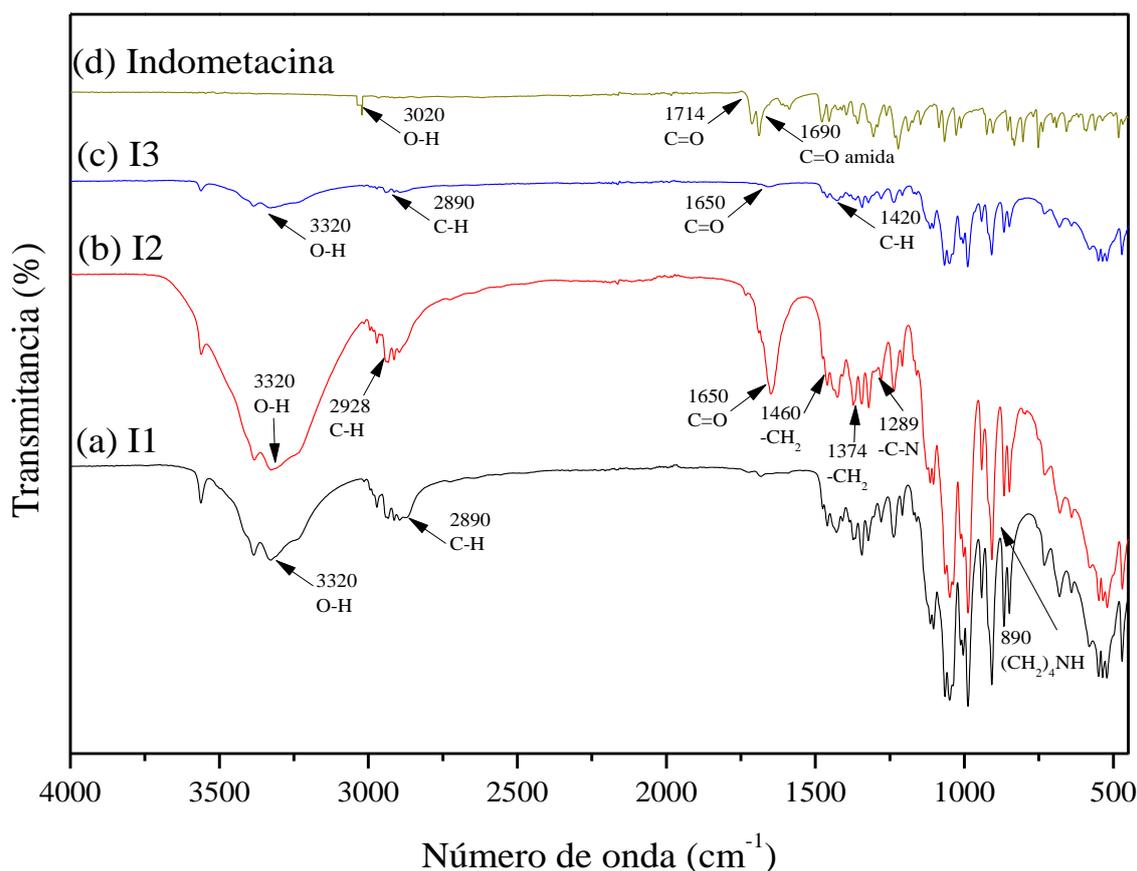


Figura A1. Espectro de FTIR de (a) I1, (b) I2, (c) I3 y (d) Indometacina.

La Figura A1 se ilustran los resultados del análisis del espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier. Los análisis se realizaron a una frecuencia de  $450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  a temperatura ambiente. El espectro de la Indometacina (Figura A1(d)) mostró bandas características de grupos carbonilo secundarios (C=O) a  $1714\text{ cm}^{-1}$ , (C=O amida) en  $1690\text{ cm}^{-1}$  y (estiramiento C–H aromático) a  $3020\text{ cm}^{-1}$ . En la Figura A1 (a), (b) y (c) muestra

los espectros de Indometacina encapsulada en P123 con diferentes mezclas poliméricas. La señal de estiramiento alrededor de  $2980\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$  es el pico más significativo asociado con P123 (Figura A1(a)).

Por otro lado, puede observarse en la Figura A1(b) un pico a aproximadamente  $890\text{ cm}^{-1}$  asignado a la vibración del anillo de pirrolidona. Por supuesto, se mostraron varios picos característicos de los grupos  $\text{--CH}$  y  $\text{=CH}$  a  $2923$ ,  $1460$  y  $1374\text{ cm}^{-1}$ . El pico a  $1285\text{--}1295\text{ cm}^{-1}$  típico para el enlace  $\text{--C--N}$  y en  $1650\text{ cm}^{-1}$  para el grupo carbonilo del PVP también fueron observados. Estos picos demostraron la presencia de PVP en el sistema I2.

La adición de PEG a P123 puede observarse en un aumento de intensidad del pico (vibración de estiramiento  $\text{O--H}$ ) a  $3320\text{ cm}^{-1}$  y un pico en  $1650\text{ cm}^{-1}$  atribuido a vibraciones de estiramiento  $\text{--C=O}$  se presentó en la Figura A1(c). Este espectro mostró picos característicos en  $3320$ ,  $2890$  y  $1420\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuyen a estiramientos  $\text{--OH}$  y  $\text{C--H}$  y flexión  $\text{--CH}$ , respectivamente.

Los picos a  $1714\text{ cm}^{-1}$  y  $1690\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la Indometacina en la matriz de los sistemas poliméricos se exhibió con menor intensidad que en comparación con su contraparte Indometacina pura. Esto indica claramente que el fármaco se ha atrapado en el núcleo hidrofóbico de los sistemas poliméricos[129].

## A.2 Primera aproximación en modelo matemático para los sistemas poliméricos

Una primera aproximación matemática que sigue el mecanismo de liberación del fármaco para los sistemas poliméricos cargados con Indometacina por difusión se describe a continuación [129]:

La difusión del fármaco a través de la membrana esta descrita por la ecuación de difusión:

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = D_m \frac{\partial^2 C_m}{\partial x^2} \quad (1)$$

donde  $C_m$  es la concentración del fármaco dentro de la membrana de espesor  $L$ ,  $D_m$  es el coeficiente de difusión del fármaco,  $t$  el tiempo y  $x$  la posición espacial.

Si se supone un régimen de transporte estacionario del fármaco a través de la membrana, es posible calcular una expresión para el flujo de fármaco a través de la membrana:

$$N_x = \frac{D_m \phi}{L} (C_1 - C_2) \quad (2)$$

En la Figura A2 se muestra un esquema del arreglo experimental para el estudio de difusión. La concentración en la pared interior de la membrana es  $C_1$  mientras que la concentración en el exterior es  $C_2$ .

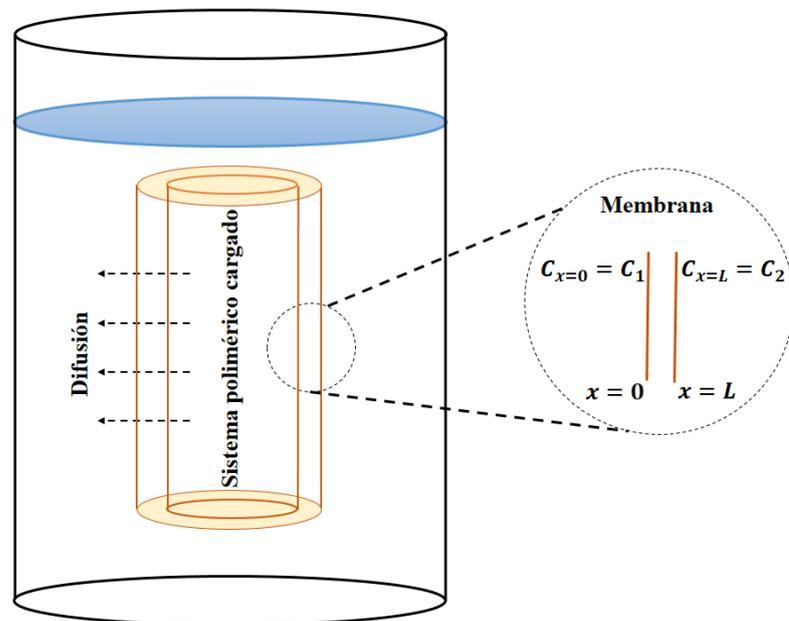


Figura A2. Representación del sistema aplicado para estudiar la liberación de fármaco.

La cantidad de fármaco que atraviesa la membrana es posible relacionarla con la tasa de pérdida de fármaco dentro del sistema contenido por la membrana:

$$-V_1 \frac{dC_1}{dt} = \frac{A_m D_m \phi}{L} (C_1 - C_2) \quad (3)$$

donde  $V_1$  es el volumen del sistema contenido por la membrana (sistema 1) y  $A_m$  es área de difusión de la misma.

De la misma forma, la pérdida de fármaco del sistema 1 esta balanceada con la ganancia de soluto en la membrana y en el sistema 2, el cual representa el volumen del vaso del recipiente ( $V_2$ ):

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = - \left( \frac{V_m}{\phi} \frac{dC_m}{dt} + V_2 \frac{dC_2}{dt} \right) \quad (4)$$

Si se toma en cuenta que:  $V_m \ll V_1, V_2$

Es posible relacionar las concentraciones de la siguiente manera:

$$C_2 = \frac{V_1}{V_2} (C_0 - C_1) \quad (5)$$

donde  $C_0$  es la concentración inicial de fármaco en el sistema 1.

Utilizando la ecuación (5) es posible integrar (3) para obtener la variación de la concentración de fármaco:

$$\frac{C_2}{C_0} = \frac{V_1}{V_2} \left( 1 - \frac{1}{(V_1 + V_2)} \left[ V_1 + V_2 e^{-\frac{A_m D_m \phi (V_1 + V_2)}{L V_1 V_2} t} \right] \right) \quad (6)$$

## LITERATURA CITADA

1. *Cáncer*. 2017 [cited 2017]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
2. Izquierdo, E., *Nanotecnología al servicio de la medicina*. 2012. p. 1-6.
3. Haque, T., *et al.*, *Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **77**(1): p. 279-89.
4. Gordon, R., *Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors*. Seminars in Oncology Nursing, 2013. **29**(3): p. 160-169.
5. Cho, K., *et al.*, *Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(5): p. 1310-1316.
6. Sáez, V., *et al.*, *Liberación controlada de fármacos. Micropartículas*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2004. **5**(2): p. 87-101.
7. Lloyd, D.J., *The problem of gel structure*. Colloid Chemistry: Theoretical and Applied, 1926. **1**: p. 767-782.
8. Nishinari, K., *Progress in Colloid and Polymer Science*, 2009. **136**: p. 87.
9. Jing, J., *et al.*, *Tunable self-assembled nanogels composed of well-defined thermoresponsive hyaluronic acid-polymer conjugates*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(32): p. 3883-3887.
10. Oh, J.K., D.I. Lee, and J.M. Park, *Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**(12): p. 1261-1282.
11. Sasaki, Y. and K. Akiyoshi, *Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications*. The Chemical Record, 2010. **10**(6): p. 366-376.
12. Raemdonck, K., J. Demeester, and S. De Smedt, *Advanced nanogel engineering for drug delivery*. Soft Matter, 2009. **5**(4): p. 707-715.
13. Flory, P.J., *Faraday Discussions of the Chemical Society*. 1974. **57**(7).
14. Hadjichristidis, N., S. Pispas, and G.A. Floudas, *Block copolymer applications, in Block Copolymers - Synthetic strategies, physical properties and applications*. 2003, John Wiley & sons: Hoboken: New Jersey.
15. Klouda, L. and A.G. Mikos, *Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **68**(1): p. 34-45.
16. Drury, J.L. and D. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
17. Ulbricht, H. and W. Hoffmann, *Surfactants Gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1996. **1**(6): p. 726-739.
18. Lewis, R.N. and R.N. McElhaney, *The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy*. Chemistry and physics of lipids, 1998. **96**(1): p. 9-21.
19. Ho, D.L., R.M. Briber, and C.J. Glinka, *Characterization of organically modified clays using scattering and microscopy techniques*. Chemistry of Materials, 2001. **13**(5): p. 1923-1931.
20. Wanka, G., H. Hoffmann, and W. Ulbricht, *Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions*. Macromolecules, 1994. **27**(15): p. 4145-4159.
21. Reinicke, S., *"Smart" Hydrogels based on Trishydrophilic Triblock Terpolymers*, in *Fach Chemie der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften*. 2010, Universität Bayreuth. p. 225.

22. Livage, J., *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 1984. **32**: p. 125.
23. Nicolai, T. and D. Durand, *Protein aggregation and gel formation studied with scattering methods and computer simulations*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2007. **12**(1): p. 23-28.
24. Mohmeyer, N. and H.W. Schmidt, *A New Class of Low-Molecular-Weight Amphiphilic Gelators*. *Chemistry-A European Journal*, 2005. **11**(3): p. 863–872.
25. Kopecek, J., *Hydrogels: From soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2009. **47**(22): p. 5929–5946.
26. Kabanov, A.V. and S.V. Vinogradov, *Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(30): p. 5418–5429.
27. Expósito, R., *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos*, in *Bioquímica y Biología Molecular I 2010*, Universidad Complutense de Madrid.
28. Ding, X., A.W. Alani, and J.R. Robinson, *Extended-release and targeted drug delivery system*, in: D.B. Troy (Ed.), in *The Science and Practice of Pharmacy*, L.W. Wilkins, Editor. 2002, 21st Edition, Remington: USA. p. 939-964.
29. Han, H.-K. and G.L. Amidon, *Targeted prodrug design to optimize drug delivery*. *AAPS PharmSci*, 2000. **2**(1): p. 48-58.
30. Murillo, M., *et al.*, *Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas*. 2001.
31. Sáez, V., E. Hernández, and L. Angulo, *Sistemas de liberación controlada de medicamentos*. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2002. **3**(1): p. 1-17.
32. Grenier, I. and R. González, *Sistemas biomaterial-droga para la liberación controlada de antibióticos*. *Biomédica*, 1994. **14**(1): p. 30-38.
33. Sáez, V., E. Hernández, and L. López, *Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas*. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2003. **4**(2): p. 111-122.
34. Ramos, D., M. Gómez, and D. Fernández, *Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral*. *Revista Cubana de Farmacia*, 2000. **34**(1): p. 70-77.
35. Doménech, J. and E. Escribano, *Preparados orales de cesión modificada: cinética*. *Biofarmacia y Farmacocinética*, in *Biofarmacia y Farmacocinética*. 1998: Madrid. p. 317-347.
36. Ríos, Á., *et al.*, *silk fibroin and their potential applications on biodegradable food packaging*. *Prospectiva*, 2017. **15**(1): p. 7-15.
37. Paños, I., N. Acosta, and A. Heras, *New drug delivery systems based on chitosan*. *Current Drug Discovery Technologies*, 2008. **5**(4): p. 333-341.
38. Sepúlveda, L.J. and C.E. Alzate, *Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: Revisión bibliográfica*. *Revista Científica*, 2016. **2**(25): p. 252-264.
39. Iborra, M.T., *Desarrollo Galénico de preparados obtenidos por interacción del Ácido 5-amino salicílico con Halloysita*, in *Farmacia y Tecnología Farmacéutica 2008*, Universidad de Granada.
40. Peñaranda, A.A. and M.E. Londoño, *Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos*. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2009. **3**(5): p. 83-94.

41. Murillo, M., *et al.*, *Controlled liberation of active principles by means of new galenic formulations*. Revista de medicina de la Universidad de Navarra, 2001. **45**(4): p. 19-34.
42. Colombo, P., *et al.*, *Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance*. Pharmaceutical Science & Technology Today, 2000. **3**(6): p. 198-204.
43. Simo, C., A. Cifuentes, and A. Gallardo, *Drug delivery systems: polymers and drugs monitored by capillary electromigration methods*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **797**(1-2): p. 37-49.
44. Ebube, N.K. and A.B. Jones, *Sustained release of acetaminophen from a heterogeneous mixture of two hydrophilic non-ionic cellulose ether polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **272**(1): p. 19-27.
45. Aragón, D.M., *et al.*, *Efecto de naproxeno microencapsulado en microesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) sobre edema plantar inducido por carragenina en ratas*. Vitae, 2010. **17**(1): p. 59-65.
46. Kopeček, J., *Hydrogel biomaterials: a smart future?* Biomaterials, 2007. **28**(34): p. 5185-5192.
47. Hassanpour, S. and M. Bagheri, *Dual-responsive semi-IPN copolymer nanogels based on poly (itaconic acid) and hydroxypropyl cellulose as a carrier for controlled drug release*. Journal of Polymer Research, 2017. **24**(6): p. 91.
48. Lee, S.H., *et al.*, *Thermally sensitive cationic polymer nanocapsules for specific cytosolic delivery and efficient gene silencing of siRNA: Swelling induced physical disruption of endosome by cold shock*. Journal of Controlled Release, 2007. **125**(1): p. 25-32.
49. Chacko, R.T., *et al.*, *Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform*. Advanced Drug Delivery Reviews 2012. **64**(9): p. 836-851.
50. Fleige, E., M. Quadir, and R. Haag, *Stimuli responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews 2012. **64**(9): p. 866-884.
51. Gao, W., J. Chan, and O. Farokhzad, *pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery*. Molecular Pharmaceutics, 2010. **7**(6): p. 1913-1920.
52. Vinogradov, S.V., *et al.*, *Polyplex Nanogel formulations for drug delivery of cytotoxic nucleoside analogs*. Journal of controlled release, 2005. **107**(1): p. 143-157.
53. Nayak, S., *et al.*, *Folate-mediated cell targeting and cytotoxicity using thermoresponsive microgels*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(33): p. 10258-10259.
54. Karagas, M.R., *et al.*, *Occurrence of other cancers among patients with prior basal cell and squamous cell skin cancer*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 1998. **7**(2): p. 157-161.
55. Landis, S.H., *et al.*, *Cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians, 1998. **48**(1): p. 6-29.
56. Marghoob, A.A., *et al.*, *Basal cell and squamous cell carcinomas are important risk factors for cutaneous malignant melanomas: screening implications*. Cancer, 1995. **75**(S2): p. 707-714.
57. Katzung G. B., *Farmacología básica y clínica*. 9a ed, ed. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., 2005.
58. Negrin M., *Carcinoma Basocelular*. Dermatología Venezolana, 2008. **46**(1): p. 4-16.

59. Aguayo, I.R., L. Ríos, and P. Jaén, *Tratamiento quirpurgico vs. no quirúrgico en el carcinoma basocelular*. Actas Dermo-Sifiliográficas, 2010. **101**(8): p. 683-692.
60. Ondo, A.L., et al., *Topical combination therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ with 5-fluorouracil cream and imiquimod cream in patients who have failed topical monotherapy*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2006. **55**(6): p. 1092-1094.
61. Gross, K., L. Kircik, and G. Kricorian, *5% 5-Fluorouracil Cream for the Treatment of Small Superficial Basal Cell Carcinoma: Efficacy, Tolerability, Cosmetic Outcome, and Patient Satisfaction*. Dermatologic surgery, 2007. **33**(4): p. 433-440.
62. Arias, J., *Novel Strategies to Improve the Anticancer Action of 5-Fluorouracil by Using Drug Delivery Systems*. Molecules, 2008. **13**(10): p. 2340-2369.
63. Fang, J.Y., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(3): p. 136-151.
64. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, *Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*. Journal Control Release, 2008. **130**(2): p. 98-106.
65. Zhao, L., et al., *Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: Preparation, optimization and in vitro characterization*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **97**(1): p. 101-108.
66. Jindal, N. and S.K. Mehta, *Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015. **129**(1): p. 100-106.
67. Zhao, Y., et al., *Pluronic P123 assisted synthesis of hollow InSn/In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hybrid nanoparticles by solution dispersion*. Applied Physics A: Materials Science & Processing, 2011. **103**(1): p. 219-223.
68. Choo, E.S., B. Yu, and J. Xue, *Synthesis of poly(acrylic acid) (PAA) modified Pluronic P123 copolymers for pH-stimulated release of Doxorubicin* Journal of Colloid and Interface Science 2011. **358**(2): p. 462-470.
69. Farage, M.A., et al., *Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review*. International Journal of Cosmetic Science, 2008. **30**(2): p. 87-95.
70. Rinnerthaler, M., et al., *Oxidative Stress in Aging Human Skin*. Biomolecules, 2015. **5**(2): p. 545-589.
71. Krutmann, J. and P. Schroeder, *Role of mitochondria in photoaging of human skin: The defective powerhouse model* Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 2009. **14**(1): p. 44-49.
72. Nichols, J.A. and S.K. Katiyar, *Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms*. Archives of Dermatological Research, 2010. **302**(2): p. 71-83.
73. Bains, V.K. and R. Bains, *The antioxidant master glutathione and periodontal health*. Dental Research Journal, 2015. **12**(5): p. 389-405.
74. Vermeij, W.P., A. Alia, and C. Backendorf, *ROS quenching potential of the epidermal cornified cell envelope*. Journal of Investigative Dermatology, 2011. **131**(7): p. 1435-1441.
75. Farris, P., et al., *Evaluation of efficacy and tolerance of a nighttime topical antioxidant containing resveratrol, baicalin, and vitamin e for treatment of mild to moderately photodamaged skin*. Journal of Drugs in Dermatology, 2014. **13**(12): p. 1467-1472.

76. Soeur, J., *et al.*, *Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: From Nrf2 activation to gsh biosynthesis.* . Free Radical Biology and Medicine, 2015. **78**(1): p. 213–223.
77. Javkhedkar, A.A., *et al.*, *Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats.* American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2015. **308**(10): p. R840-R846.
78. Schwarz, J.C., *et al.*, *Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q10.* International journal of pharmaceutics, 2013. **447**(1): p. 213–217.
79. Lohan, S.B., *et al.*, *Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **89**(1): p. 201–207.
80. Lorencini, M., *et al.*, *Active ingredients against human epidermal aging.* Ageing research reviews, 2014. **15**(1): p. 100–115.
81. Fachinetto, J.M., *et al.*, *Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on Allium cepa root-tip compared to the free drug.* Latin American Journal of Pharmacy, 2008. **27**(5): p. 668 – 673.
82. Zhao, L.Y. and W.M. Zhang, *Recent progress in drug delivery of pluronic P123: pharmaceutical perspectives.* Journal of Drug Targeting, 2017. **25**(6): p. 471-484.
83. Prudic, A., *et al.*, *Influence of copolymer composition on the phase behavior of solid dispersions.* Molecular Pharmaceutics, 2014. **11**(11): p. 4189-4198.
84. Gupta, B.S., B.R. Chen, and M.J. Lee, *Solvation consequences of polymer PVP with biological buffers MES, MOPS, and MOPSO in aqueous solutions.* The Journal of Chemical Thermodynamics, 2015. **91**(1): p. 62-72.
85. Ma, X., J. Taw, and C.M. Chiang, *Control of drug crystallization in transdermal matrix system.* International Journal of Pharmaceutics, 1996. **142**(1): p. 115-119.
86. Hałupka, M., *et al.*, *Doxorubicin loaded PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) coated magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2015. **384**(1): p. 320-327.
87. Zhang, C., *et al.*, *Formation of micelles of Pluronic block copolymers in PEG 200.* Journal of Colloid and Interface Science, 2008. **327**(1): p. 157-161.
88. Zhang, K., *et al.*, *PEG-PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications.* Journal of Controlled Release, 2014. **183**(1): p. 77-86.
89. Barmplexis, P., *et al.*, *Development of PVP/PEG mixtures as appropriate carriers for the preparation of drug solid dispersions by melt mixing technique and optimization of dissolution using artificial neural networks.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013. **85**(3): p. 1219–1231.
90. Bikiaris, D.N., *Solid dispersions, part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs.* Expert Opinion on Drug Delivery, 2011. **8**(11): p. 1501-1519.
91. Papageorgiou, G.Z., *et al.*, *Effect of physical state and particle size distribution on dissolution enhancement of nimodipine/PEG solid dispersions prepared by melt mixing and solvent evaporation.* The AAPS Journal 2006. **8**(4): p. E623-E631.
92. Lipinski C., *Poor aqueous solubility an industry wide problem in drug discovery.* American Pharmacology Review, 2002. **5**(3): p. 82–85.
93. Caldwell, G.W., *et al.*, *The new pre-preclinical paradigm: compound optimization in early and late phase drug Discovery.* Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001. **1**(5): p. 353–366.

94. Clarysse, S., *et al.*, *Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs*. *Pharmaceutical Research*, 2009. **26**(6): p. 1456–1466.
95. Rogers, J., *et al.*, *Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1993. **43**(8): p. 1609-1609.
96. Soeken, K.L., *et al.*, *Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis*. *The Journal of Family Practice*, 2002. **51**(5): p. 425-30.
97. Sunel, V., *et al.*, *Synthesis of New Methionine Derivatives for the Treatment of Paracetamol - Induced Hepatic Injury*. *Eurasian Chemico-Technological Journal*, 2002. **4**(1): p. 285-292.
98. Peskin, A.V. and C.C. Winterbourn, *Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate, and methionine and with intracellular glutathione*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003. **35**(10): p. 1252-1260.
99. Chung, T.K. and D.H. Baker, *Efficiency of dietary methionine utilization by young pigs*. *The Journal of Nutrition*, 1992. **122**(9): p. 1862-1869.
100. Levine, R.L., J. Moskovitz, and E.R. Stadtman, *Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2000. **50**(4-5): p. 301-307.
101. Levine, R.L., *et al.*, *Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(26): p. 15036-15040.
102. Jeandet, P., *et al.*, *Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995. **43**(2): p. 316-319.
103. Hung, C.F., *et al.*, *Delivery of Resveratrol, a Red Wine Polyphenol, from Solutions and Hydrogels via the Skin*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008. **31**(5): p. 955-962.
104. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. *Nature Reviews. Drug discovery*, 2006. **5**(6): p. 493-506.
105. Marier, J.F., *et al.*, *Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002. **302**(1): p. 369-373.
106. Baxter, R.A., *Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation*. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2008. **7**(1): p. 2–7.
107. Huang, Z.R., Y.K. Lin, and J.Y. Fang, *Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology*. *Molecules*, 2009. **14**(1): p. 540-554.
108. Allevato, M., M. Marini, and M. Branciforte, *Fármacos antineoplásicos cutáneos. Actualizaciones terapéuticas dermatológicas*, 2008. **31**(1): p. 222-231.
109. Hadjikirova, M., P. Troyanova, and M. Simeonova, *Nanoparticles as drug carrier system of 5-fluorouracil in local treatment of patients with superficial basal cell carcinoma*. *Journal-Balkan Union of Oncology*, 2005. **10**(4): p. 517-521.
110. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. *Nature reviews. Cancer*, 2003. **3**(5): p. 330-338.
111. Telò, I., *et al.*, *Mechanisms of imiquimod skin penetration*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016. **511**(1): p. 516-523.
112. C., F. and G. C., *Uso de imiquimod en infantes*. *Dermatology Pediatric Latin*, 2006. **4**(3): p. 232-239.

113. Venturini, C.G., et al., *Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **79**(1): p. 36-43.
114. Moreira, T., A. Gutiérrez, and H. Delgado, *Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos*. Biotecnología Aplicada, 1994. **11**(2): p. 113–119.
115. Miller, T., et al., *Drug loading of polymeric micelles*. Pharmaceutical Research, 2013. **30**(2): p. 584–595.
116. Alvarez, J., et al., *Star polymers with random number of temperature sensitive arms and crosslinked poly(EGDMA)-core and their application to drug delivery*. Reactive & Functional Polymers, 2011. **71**(11): p. 1077–1088.
117. Joubert, L.M., *Visualization of Hydrogels with Variable-Pressure SEM*. Microscopy and Microanalysis, 2009. **15**(Suppl 2): p. 1308-1309.
118. R., N., *Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic® (PEO–PPO–PEO) block copolymers*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999. **16**(1): p. 55–72.
119. Taylor, P.D. and P. Schutyser, *Weighted linear regression applied in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry—a review of the statistical considerations involved*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 1986. **41**(10): p. 1055-1061.
120. Martin, J., A.R. Gracia, and A.G. Asuero, *Fitting Nonlinear Calibration Curves: No Models Perfect*. Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation, 2017. **7**(1): p. 1-17.
121. Ali, M.S., G. Ghosh, and D. Kabir ud, *Amphiphilic drug persuaded collapse of polyvinylpyrrolidone and poly(ethylene glycol) chains: A dynamic light scattering study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(2): p. 590-594.
122. Rijcken, C.J., et al., *Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: Synthesis, characterisation and in vivo studies*. Biomaterials, 2007. **28**(36): p. 5581–5593.
123. Ghaffari, S., et al., *Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**(1): p. 35-43.
124. [www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp?\\_requestid=440](http://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp?_requestid=440), *E. coli Cell Culture Concentration from OD600 Calculator* 2017: Agilent.
125. Ramasamy, M., D.K. Yi, and S.S.A. An, *Enhanced detection sensitivity of Escherichia coli O157: H7 using surface-modified gold nanorods*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**(Spec Iss): p. 179.
126. Bespalov, V.A., I.B. Zhulin, and B.L. Taylor, *Behavioral responses of Escherichia coli to changes in redox potential*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(19): p. 10084-10089.
127. Kim, K.S. and S.J. Park, *Effect of porous silica on sustained release behaviors of pH sensitive pluronic F127/poly(acrylic acid) hydrogels containing tulobuterol*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **80**(2): p. 240-246.
128. Andretta, H.A., *Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos*. Acta Farmaceutica Bonaerense, 2003. **22**(4): p. 355-364.
129. Arroyo, E., et al., *Study of a controlled release polymeric system based on Pluronic P123: Spectroscopic characterization and theoretical model approach*. Journal of Molecular Structure, 2017. **1138**: p. 172-176.