



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS DE N-ISOPROPIL ACRILAMIDA Y ÁCIDO METACRÍLICO PARA LA OBTENCIÓN DE NANOGELES SENSIBLES AL PH

Tesis que presenta

CARLOS EDUARDO BELMAN FLORES

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

MATERIALES POLIMÉRICOS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

ENERO, 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, resultados y discusión de este documento, proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., que a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Intelectual, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco de que igual manera, los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven, o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente a l Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Mérida, Yucatán, México; 06 de enero de 2020.

Ing. Carlos Eduardo Belman Flores

DEDICATORIA

Con amor, para mis padres: María Joaquina Flores Ramos y Benigno Belman Rojas, y mi hermano, Héctor Ernesto. Siempre me han impulsado para salir adelante, brindándome mucho amor y sabios consejos. Su trabajo y dedicación me han inspirado desde siempre, permitiéndome cumplir este logro académico y profesional, que a ustedes debo y con mucho gusto comparto.

Alejandro Viera, por tu incondicional compañía y por recorrer este camino a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgar la beca de manutención No. 634809; la beca de movilidad nacional, y por el financiamiento recibido a través de los proyectos CB-2016-283972 y 268595.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos en los laboratorios de la Unidad de Materiales (Química Macromolecular, Fisicoquímica y Biomateriales).

Dr. José Manuel Cervantes Uc, muchas gracias por brindarme un lugar en su grupo de trabajo para la realización de este proyecto bajo su dirección. Sinceramente le agradezco por los conocimientos transmitidos, la confianza brindada, así como todo el tiempo, la paciencia, la oportunidad de participar en diferentes actividades académicas y sobre todo, el haber compartido su gusto por la ciencia conmigo.

Dr. Humberto Vázquez Torres, mi gratitud por haber aceptado ser parte fundamental de este proyecto al fungir como mi codirector; así como también por haberme recibido en su laboratorio en la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, el poder haber trabajado con usted fue muy enriquecedor.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por los comentarios, aportaciones y sugerencias que hicieron posible la mejora de este trabajo, así como su participación activa como miembro del comité tutorial.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por la colaboración durante la caracterización biológica de los materiales, así como por sus sugerencias y el tiempo dedicado para la revisión de esta tesis.

Este trabajo no habría sido el mismo sin el apoyo técnico de diferentes personas que facilitaron la caracterización de las muestras, es por ello que destaco la excelente labor realizada por el Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao en la parte fisicoquímica; a la Q.I. Rossana Faride Vargas Coronado por su apoyo con las mediciones de dispersión de luz y las capacitaciones para el uso de los equipos y al Dr. Alejandro May Pat por la obtención de las imágenes AFM de los látex.

Al Dr. Iván Oliva Arias, por su disposición para la obtención de las micrografías FE-SEM, además de participar como revisor de esta tesis y sinodal.

A la M.C. Dora Alicia Huerta, del Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del CINVESTAV – Mérida, por su labor realizada con las micrografías FE-SEM

A mis compañeros y amigos del posgrado, por el apoyo académico, técnico y moral dentro y fuera de los laboratorios.

ÍNDICE

Pá	g.
NDICE DE TABLAS	
NDICE DE FIGURAS	
RESUMENX	
ABSTRACTXI	
NTRODUCCIÓN1	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL	
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO6	
1.1 Hidrogeles	
1.2 Hidrogeles inteligentes	
1.2.1 Sensibilidad a la temperatura8	
1.2.2 Sensibilidad al pH10	
1.3 Síntesis de hidrogeles	
1.4 Antecedentes	
2 CAPÍTULO II METODOLOGÍA	
2.1 Materiales	
2.2 Síntesis de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA)	
2.3 Caracterización de las emulsiones	
2.3.1 Rendimiento de la reacción	
2.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica22	
2.3.3 Dispersión Dinámica de Luz	
2.4 Caracterización de las partículas en estado sólido	
2.4.1 Obtención de las partículas en estado sólido	

2.4.2 E	Evaluación morfológica	23
2.4.3 E	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	24
2.4.4 E	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (¹H-RMN)	24
2.4.5 A	Análisis termogravimétrico (TGA)	24
2.5 Eva	aluación de la sensibilidad a cambios de pH y temperatura	24
2.6 Ca	racterización biológica	26
2.6.1 E	Ensayo de hemólisis	26
2.6.2 (Cultivo celular	26
2.6.2	2.1 Elaboración de medios condicionados	27
2.6.2	2.2 Proliferación de células endoteliales (BAOEC)	27
2.6.2	2.3 Morfología mediante tinción violeta	28
3.1 Efe P(NIPAM	ecto del contenido de BIS sobre las propiedades de nanopartícula -co-MAA).	s 30
3.1.1 0	Caracterización de las emulsiones	30
3.1.1	1.1 Síntesis de los copolímeros	50
3.1.1		30
3.1.1	1.2 Aspecto de las emulsiones.	30 30 31
3.1.1	1.2Aspecto de las emulsiones.1.3Rendimiento de reacción.	30 30 31 32
312 (1.2 Aspecto de las emulsiones. 1.3 Rendimiento de reacción. 1.4 Tamaño de las partículas. 	30 30 31 32 32
0.1.2 (1.2 Aspecto de las emulsiones. 1.3 Rendimiento de reacción. 1.4 Tamaño de las partículas. Caracterización de las partículas en estado sólido. 	30 30 31 32 32 34
3.1.2	 1.2 Aspecto de las emulsiones. 1.3 Rendimiento de reacción. 1.4 Tamaño de las partículas. Caracterización de las partículas en estado sólido. 2.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). 	30 31 32 32 32 34 34
3.1.2 3.1.2	 1.2 Aspecto de las emulsiones. 1.3 Rendimiento de reacción. 1.4 Tamaño de las partículas. Caracterización de las partículas en estado sólido. 2.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). 2.2 Resonancia Magnética Nuclear 	30 31 32 32 34 34 35
3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2	 1.2 Aspecto de las emulsiones. 1.3 Rendimiento de reacción. 1.4 Tamaño de las partículas. Caracterización de las partículas en estado sólido. 2.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) 2.2 Resonancia Magnética Nuclear 2.3 Análisis Termogravimétrico. 	30 31 32 32 32 34 34 35 36
3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.3	 1.2 Aspecto de las emulsiones. 1.3 Rendimiento de reacción. 1.4 Tamaño de las partículas. Caracterización de las partículas en estado sólido. 2.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) 2.2 Resonancia Magnética Nuclear 2.3 Análisis Termogravimétrico. Caracterización de los hidrogeles: sensibilidad a estímulos. 	30 30 31 32 32 34 34 35 36 37

3.1.3.2 Sensibilidad a la temperatura.
39
3.1.4 Caracterización biológica
40
3.1.4.1 Hemólisis.
40

3.2	Efecto de la concentración de ácido metacrílico en las nanopartículas	
P(NIP/	AM-co-MAA) entrecruzadas con BIS 6%:	43

3.2.1 Cara	cterización de las emulsiones	44
3.2.1.1	Aspecto de las emulsiones y tamaño de partícula	44
3.2.1.2	Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	46
3.2.2 Cara	cterización de las partículas en estado sólido	47
3.2.2.1	Microscopía electrónica de barrido - emisión de campo (FE-SEM	1). 47
3.2.2.2	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	50
3.2.2.3	Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹ H-RMN)	51
3.2.2.4	Análisis termogravimétrico (TGA)	52
3.2.3 Cara	cterización de los hidrogeles: sensibilidad a estímulos	53
3.2.3.1	Sensibilidad al pH y a la temperatura	53
3.2.4 Cara	cterización biológica	55
3.2.4.1	Hemólisis	55
3.2.4.2	Cultivo de células endoteliales (BAOEC).	56

CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Formulaciones de las partículas P(NIPAM-co-MAA) generadas a partir de la
variación en la cantidad de MAA y de agente entrecruzante
Tabla 3.1 Coeficientes Alfrey-Price de los monómeros NIPAM, MAA y BIS, así como las
razones de reactividad calculadas para cada par de monómeros calculados de
la referencia [34]
Tabla 3.2 Rendimiento de la reacción de las partículas P(NIPAM-co-MAA) con diferente
cantidad de agente entrecruzante 32
Tabla 3.3 Efecto del pH sobre el tamaño de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) en PBS a
25 °C
Tabla 3.4 Efecto del pH sobre el tamaño de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) en PBS a
37 °C
Tabla 3.5 Tamaño de partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS6%, rendimiento de la reacción y
pH de las emulsiones45
Tabla 3.6 Efecto del pH y la temperatura del medio sobre el radio hidrodinámico de los
hidrogeles P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% en PBS (1 mg/mL)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Hidrogeles a base de poli(acrilamida): El lado izquierdo representa su estado
deshidratado y, a la derecha se encuentra hinchado y en equilibrio. Tomado
de la referencia [5]6
Figura 1.2 Representación de la respuesta de un hidrogel inteligente a distintos tipos de
estímulos. Tomado de la referencia [12]7
Figura 1.3 Cadenas de P(NIPAM) en solución: a) en su estado hidratado debido a
interacciones con el agua; b) en estado colapsado, el cual ocurre al
incrementar la temperatura por encima de la LCST (32 °C), mediante la
formación de puentes de hidrógeno entre cadenas poliméricas. Adaptado de
[17]
Figura 1.4 Evolución de las publicaciones relacionadas con la PNIPAM: a) en el área
biomédica (verde) y otras áreas (azul); b) Porcentaje de las publicaciones en
el área biomédica por aplicación. Tomado de la referencia [17]
Figura 1.5 Hidrogel polimérico a base de un derivado del ácido acrílico: a la izquierda se
representa el estado no ionizado, donde se favorecen las interacciones entre
los grupos colgantes. Al ocurrir un cambio de pH en el ambiente, el grupo
carboxílico se ioniza e incrementan las repulsiones electrostáticas entre las
cadenas (derecha). Modificado de la referencia [21]
Figura 1.6 Evolución de la velocidad (dx/dt) y grado de polimerización (x) durante las 3
etapas de una polimerización en emulsión. Adaptado de la referencia [27] 14
Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS
 Figura 2.1 Síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS

Figura 3.6 Interacción de las nanopartículas P(NIPAM) y P(NIPAM-co-MAA)	
entrecruzadas con diferentes cantidades de BIS con sangre	1
Figura 3.7 Hemólisis asociada a la cantidad de BIS como agente entrecruzante en	
partículas P(NIPAM) y P(NIPAM-co-MAA)4	1
Figura 3.8 Influencia de la temperatura en el aspecto de las emulsiones P(NIPAM)-BIS	
6% y su relación con la transición de volumen de las partículas suspendidas.	
	4
Figura 3.9 Látex de P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% obtenidos mediante polimerización por	
emulsión4	5
Figura 3.10 Micrografías AFM de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	5
Figura 3.11 Micrografías FE-SEM de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% donde se	
observa la morfología, la distribución de tamaño y tamaño promedio4	7
Figura 3.12 Partículas P(NIPAM) entrecruzadas con BIS: micrografías FE-SEM de la	
emulsión liofilizado obtenidas en este trabajo (arriba), micrografías CrioSEM	
presentadas por Deptula [30] (abajo)4	8
Figura 3.13 Diámetro aparente medido por AFM, FE-SEM y DLS a las partículas	
Р(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% 4	9
P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9)
P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9) 1
P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1
P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2 4
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2 4 5
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2 4 5
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2 4 5 5
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2 4 5 5
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	901 245 3
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	901 2 45 5 7
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	901 245 57
 P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%	9 0 1 2 2 4 5 5 5 7 7

RESUMEN

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas, a base de N-isopropil acrilamida y ácido metacrílico (NIPAM/MAA), con diferentes razones molares, para generar hidrogeles sensibles a cambios de pH que fueron caracterizados fisicoquímica y biológicamente. Se obtuvieron emulsiones estables y con rendimientos mayores al 90%. Los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón confirmaron la síntesis exitosa de los copolímeros. Las micrografías de fuerza atómica y electrónica de barrido por emisión de campo mostraron partículas nanométricas, con una morfología esférica, la cual se vio ligeramente comprometida al aumentar el contenido de MAA. El tamaño de los nanogeles también disminuyó con la cantidad de ácido metacrílico, mientras que su volumen aumentó significativamente con el pH del medio. La caracterización biológica reveló que los materiales fueron hemocompatibles y no mostraron citotoxicidad con células endoteliales, aunque un incremento en el contenido de MAA condujo a un ligero aumento en el porcentaje de hemólisis, pero éste no fue significativo. Adicionalmente, se estudió el efecto del agente entrecruzante sobre algunas propiedades de las nanopartículas. Los resultados sugieren que los nanogeles a base de P(NIPAM-co-MAA) podrían ser utilizados como sistemas transportadores inteligentes para la liberación de fármacos, en particular cuando estén involucrados cambios de pH a nivel fisiológico.

ABSTRACT

In this work, pH-sensitive hydrogel nanoparticles based on N-isopropyl acrylamide (NIPAM) and methacrylic acid (MAA) at various molar ratios, were synthesized and characterized in terms of physicochemical and biological properties. Infrared and proton nuclear magnetic resonance spectra confirmed the successful synthesis of the copolymer nanoparticles. Force atomic images and field emission scanning electronic micrographs showed that nanoparticles were spherical, but their round-shape was slightly compromised with the MAA content, besides size of particles tends to decrease as the MAA content increased. The hydrogels nanoparticles exhibited an interesting pH-sensitivity, displaying changes in the particle size when pH media increased. Biological characterization indicates that all the synthesized particles are hemocompatible and non-cytotoxic, although an increase of the MAA content tends to increase the hemolysis percentage. Additionally, the influence of BIS crosslinker agent content was studied in order to determine its effect on some properties. Results suggest that the pH-sensitivity hydrogels based on P(NIPAM-co-MAA) nanoparticles may be used as a versatile platform as self-regulated drug delivery systems in response to environmental pH changes.

INTRODUCCIÓN

Los biomateriales surgen con la intención de sustituir, reparar o mejorar la función de un tejido u órgano, perteneciente a un sistema biológico que se encuentra en condiciones patológicas o ha sufrido un traumatismo, para devolverlo a un estado funcional y sano, siempre ofreciendo una mejoría en la calidad de vida. La generación de nuevos biomateriales ofrece soluciones innovadoras a problemáticas existentes y al mismo tiempo permite el avance científico y tecnológico. El desarrollo de biomateriales de escala nanométrica ha revolucionado la aplicación de éstos debido a que poseen características superiores en comparación con las que presentan su contraparte en macroescala, principalmente aquellas relacionadas con sus propiedades superficiales (mayor área superficial, distribución de grupos funcionales en la superficie, entre otras) [1].

Los materiales que ofrecen una arquitectura nanoestructurada mejoran la proliferación celular al ofrecer una mayor área superficial para su adhesión, por lo cual resultan viables para la regeneración de tejidos. De forma similar, se pueden utilizar nanopartículas como vehículos para el transporte de medicamentos o moléculas biológicamente activas, capaces de dirigirse hacia un tejido u órgano en específico, o bien, realizar la liberación de su contenido en función de las condiciones o necesidades fisiológicas, mejorando la actividad terapéutica y farmacológica del compuesto administrado; esto, a su vez, reduce los efectos secundarios adversos; al disminuir la dosis suministrada, existe una mejora en los costos del tratamiento [2].

La aplicación de materiales, de tamaño nanométrico, como sistemas transportadores de fármacos, dependen principalmente de la forma y tamaño del sistema de liberación de fármaco (conforme el tamaño se reduce, la relación que existe entre el área superficial y el volumen se incrementa, lo cual implica que el fármaco se encuentra disponible más cerca de la superficie, en comparación con las partículas más grandes, y consecuentemente existirá una liberación más rápida). Sin embargo, los sistemas desarrollados con esta finalidad tienen que superar tres limitantes: la cantidad de fármaco que pueden transportar, el efecto citotóxico que generan y la capacidad de alcanzar el sitio específico para la liberación de su contenido.

Por ejemplo, las partículas mayores a 300 nm pueden activar el sistema linfático y ser eliminadas de la circulación mediante filtración esplénica en el bazo, atrapadas por los

1

fagocitos, o depositarse en los pulmones, razones por las cuales el tamaño de partículas influye considerablemente en la administración *in vivo* del fármaco [3].

Los sistemas de liberación de fármacos se elaboran a través de diferentes procesos físicos o químicos, y utilizan una diversidad de materiales que pueden obtenerse de fuentes naturales, como es el caso de polisacáridos o polipéptidos, o bien, recurrir al uso de productos sintéticos (polímeros, cerámicos o metales); esto último conduce a la obtención de vehículos acarreadores de fármacos con propiedades específicas dependientes de su composición. Debido a la capacidad de modificar fácilmente su composición y, por ende, las propiedades de los polímeros, éstos han sido utilizados para el desarrollo de sistemas nanotransportadores de distinta naturaleza; desde modelos sencillos, como los reservorios densos o huecos, pasando por estructuras ramificadas o reticuladas, conjugados en los que el fármaco se encuentra unido a la cadena polimérica, hasta sistemas del tipo micelar o de bicapa, entre otras.

En el presente trabajo se sintetizaron y caracterizaron hidrogeles sensibles a cambios de temperatura y pH, a base de copolímeros N-isopropil acrilamida/ácido metacrílico (NIPAM/MAA) y utilizando N,N'-metilen-bis-acrilamida (BIS) como agente entrecruzante. Así, se obtuvieron látex con diferente composición (relación NIPAM/MAA y contenido de BIS) para estudiar la influencia tanto de la relación de monómeros en el copolímero, como del agente reticulante, sobre las propiedades de las partículas. Con base en los resultados obtenidos, se eligió la formulación que mostró los resultados más prometedores para investigar, con mayor profundidad, el efecto del MAA como comonómero y, de esta manera, proponer una formulación con potencial uso como sistema para la liberación inteligente de fármacos.

Para una mejor comprensión de la temática abordada en esta tesis, el contenido de este escrito se organizó en tres capítulos; en el Capítulo I se presenta el marco teórico, donde se incluye información sobre los hidrogeles inteligentes, sus características más importantes, el método de síntesis empleado y los antecedentes más relevantes; en el Capítulo II se describe de manera detallada la metodología utilizada para la preparación y caracterización de los hidrogeles obtenidos y; posteriormente el Capítulo III, se presentan los resultados obtenidos así como la discusión de los mismos. Finalmente, se muestran las Conclusiones del trabajo, así como también un apartado con algunas sugerencias para trabajos futuros.

HIPÓTESIS

La incorporación de ácido metacrílico en partículas a base de N-isopropil acrilamida, entrecruzadas con N,N'-metilen-bis-acrilamida modificará las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y biológicas de éstas, siendo posible obtener nanogeles sensibles ante cambios de pH y temperatura y que no generen efectos adversos a nivel celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la composición en copolímeros de N-isopropil acrilamida (NIPAM) con ácido metacrílico (MAA) y entrecruzados con N,N'-metilen-bis-acrilamida (BIS), sobre las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y biológicas de los nanogeles que generen.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar copolímeros a base de NIPAM y MAA, a distintas proporciones, utilizando BIS como agente entrecruzante.
- Determinar la concentración adecuada de agente entrecruzante en las formulaciones a partir de las propiedades fisicoquímicas (FTIR, 1H-RMN, TGA y DLS) y biológicas (hemocompatibilidad).
- Evaluar la influencia de la concentración de MAA sobre la morfología, propiedades fisicoquímicas (FTIR, 1H-RMN, TGA y DLS) y biológicas (hemocompatibilidad y proliferación de células endoteliales).de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con BIS.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras macromoleculares tridimensionales obtenidas a partir de polímeros naturales o sintéticos, cuya naturaleza altamente hidrofílica las hace capaces de absorber grandes cantidades de agua sin llegar a disolverse en ésta, ya que las cadenas poliméricas que los componen se encuentran interconectadas a través enlaces covalentes (entrecruzamiento químico) o interacciones físicas (entrecruzamiento físico). Al entrar en un medio acuoso, estas estructuras se hinchan hasta alcanzar un estado de equilibrio en donde ocurre un balance entre las fuerzas osmóticas, que se originan al difundirse el agua hacia la red macromolecular, y las fuerzas cohesivas ejercidas por las cadenas que se oponen a la expansión e impiden que el polímero se disuelva [4].

En el lado izquierdo de la Figura 1.1 se muestra el aspecto de un hidrogel deshidratado, también conocido como xerogel, elaborado a partir de poli(acrilamida), mientras que en el lado derecho se presenta el mismo gel en su estado hidratado [5]. Es posible identificar que, como consecuencia de la hidratación o hinchamiento, los hidrogeles incrementan dramáticamente su volumen en comparación con el que tienen estando secos; adicionalmente exhiben propiedades mecánicas cercanas a las que presentan los tejidos blandos vivos [6]. Es por esto que los hidrogeles han sido investigados ampliamente para la liberación de fármacos [7-13] ya que el agua retenida en su interior permite la difusión de algunas moléculas hidrosolubles, mientras que la estructura polimérica reticulada actúa como un reservorio resistente, permitiendo el almacenaje y transporte de distintos tipos de solutos.



Figura 1.1 Hidrogeles a base de poli(acrilamida): El lado izquierdo representa su estado deshidratado y, a la derecha se encuentra hinchado y en equilibrio. Tomado de la referencia [5].

1.2 Hidrogeles inteligentes.

Los hidrogeles que poseen la capacidad de responder a estímulos que ocurren en su entorno y en consecuencia presentan cambios drásticos en propiedades tales como su volumen, son llamados hidrogeles inteligentes [4, 12]. Estas modificaciones estructurales son reversibles; es decir, cuando el estímulo (cambios de pH, temperatura, ultrasonido, luz, esfuerzos mecánicos, campo eléctrico, campo magnético, concentración iónica, concentración de enzimas o biomoléculas, etc.,) es retirado, los cambios desaparecen, recuperando así su forma inicial, tal y como se representa en la Figura 1.2.



Figura 1.2 Representación de la respuesta de un hidrogel inteligente a distintos tipos de estímulos. Tomado de la referencia [12].

Los estímulos a los que los hidrogeles son sensibles pueden producirse de forma artificial o controlada, o bien, ser desencadenados naturalmente por el medio fisiológico como respuesta de retroalimentación al metabolismo, cambios asociados a enfermedades, alteraciones en la función normal, así como la presencia de cuerpos posiblemente patogénicos. Idealmente, los hidrogeles inteligentes deben de tener una respuesta instantánea al estímulo; sin embargo, esto no es posible porque el cambio en el volumen del hidrogel está gobernado por un mecanismo de absorción (o desorción) del medio acuoso, lo cual implica fenómenos de difusión como el de las moléculas del disolvente a través de la red polimérica.

Este proceso de hinchamiento es lento y, se ralentiza aún más al acercarse al punto crítico de la transición de fase, por lo cual se han identificado algunas estrategias para optimizar las tasas de respuesta de hidrogeles inteligentes [14]; entre éstas se pueden mencionar las siguientes:

- Incrementar la porosidad: si se visualiza al hidrogel como una matriz, el aumentar los espacios vacíos en su interior mejorará la interconexión de los poros, generando que el hinchamiento (o contracción) sea más rápido que la difusión típica en un sistema menos poroso.
- II. Injertar cadenas lineales: el injerto de cadenas poliméricas en la periferia de la red favorece la respuesta ya que éstas responderán primero al estímulo al no estar reticuladas
- III. Elaborar partículas submicrométricas: la velocidad de respuesta de un gel es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del diámetro del gel, por lo que al formar geles de escala micro o nanométrica (también llamados microgeles o nanogeles, respectivamente) éstos absorberán o liberarán su contenido mucho más rápidamente que los hidrogeles de escala macroscópica (*bulk gels*).

1.2.1 Sensibilidad a la temperatura.

Los polímeros termosensibles experimentan un cambio abrupto en su solubilidad como respuesta a un cambio en la temperatura de la disolución. Uno de los polímeros más utilizados para el desarrollo de hidrogeles sensibles a la temperatura es la poli(N-isopropil acrilamida), abreviada como P(NIPAM), debido a su capacidad de gelación termorreversible cuando se encuentra en un medio acuoso. Si la temperatura de la solución supera el valor conocido como temperatura de solución crítica mínima (*Lower Critical Solution Temperature*, LCST), que es de 32 °C para el P(NIPAM) según lo reportado en la literatura [15], el polímero presenta una transición del tipo sol-gel, y las cadenas poliméricas en la disolución precipitarán. Sin embargo, si la solución regresa a las condiciones iniciales de temperatura, la P(NIPAM) se solubilizará nuevamente.

En la Figura 1.3 se representa el comportamiento en solución de un hidrogel elaborado con P(NIPAM). En la Figura 1.3a se aprecia la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares de la cadena polimérica (carbonilo y amina secundaria) con las moléculas del disolvente (en este caso, agua). Si la temperatura de la disolución aumenta (Figura 1.3b), la energía suministrada rompe estas atracciones débiles, favoreciendo la generación de interacciones de tipo puente de hidrógeno entre los grupos amida de la misma cadena o entre cadenas adyacentes [16].



Figura 1.3 Cadenas de P(NIPAM) en solución: a) en su estado hidratado debido a interacciones con el agua; b) en estado colapsado, el cual ocurre al incrementar la temperatura por encima de la LCST (32 °C), mediante la formación de puentes de hidrógeno entre cadenas poliméricas. Adaptado de [17].

Desde su descubrimiento en 1968, la P(NIPAM) ha sido objeto de estudio para numerosas aplicaciones biomédicas [18] debido a que: presenta solubilidad en medios acuosos, la transición de volumen ocurre a temperatura cercana a la fisiológica, y que puede obtenerse fácilmente mediante síntesis química en forma de homopolímeros, copolímeros en bloque, e injertos sobre otros polímeros o hidrogeles. En la Figura 1.4a se muestra un registro de la cantidad de artículos científicos, que son publicados a nivel mundial cada año, en los cuales se utiliza el P(NIPAM) para distintas aplicaciones (física, astronomía, ciencias medioambientales, energías, entre otras) [17]. Además, los autores resaltan las aplicaciones dentro del campo biomédico e identifican que el área donde más se explotan las propiedades de este polímero es la liberación de fármacos, seguida por la ingeniería de tejidos, tal y como se observa en la Figura 1.4b.



Figura 1.4 Evolución de las publicaciones relacionadas con la PNIPAM: a) en el área biomédica (verde) y otras áreas (azul); b) Porcentaje de las publicaciones en el área biomédica por aplicación. Tomado de la referencia [17].

1.2.2 Sensibilidad al pH.

La sensibilidad de un compuesto al pH se debe a que su estructura química cuenta con grupos funcionales ionizables; por lo tanto, al estar en medio acuoso, estos grupos se disocian en iones, brindándole a la solución un comportamiento similar al de un electrolito [19]. Cuando el compuesto que genera una respuesta al cambiar el pH del medio es un polímero, entonces se habla de un polielectrolito. En ellos se modifica la interacción electrostática entre los grupos funcionales ionizados, generándose un cambio en la conformación del polímero y propiciando la separación de fases en la disolución [20]. Los polielectrolitos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Poliácidos: Las cadenas poliméricas cuentan con grupos funcionales que pueden ceder protones en solución. Si el pH es bajo, el grupo funcional se mantiene protonado. Mientras que si el pH alto (alcalino), el polímero cede protones (H⁺), generando repulsión electrostática entre los grupos adyacentes. La funcionalidad más representativa de los poliácidos es el ácido carboxílico (-COOH), aunque los grupos sulfónico (-SO₃H) y fosfonato (PO₃H₂) también presentan este comportamiento.
- 2. *Polibases*: Los grupos amino, imino o amonio cuaternario presentan un comportamiento inverso a los poliácidos, debido a su naturaleza química, puesto que aceptan protones a un pH bajo y donan protones a un pH neutro.

Los ácidos débiles como, por ejemplo, los ácidos carboxílicos y fosfóricos, aumentan su ionización al incrementar el pH del medio. De esta forma, el número de cargas en la red polimérica provoca un incremento en las repulsiones electrostáticas entre las cadenas, al mismo tiempo que se produce un aumento en la hidrofobicidad de la red. Esto trae como consecuencia el favorecimiento de la difusión del soluto contenido en el hidrogel (durante su hinchamiento), tal y como se esquematiza en la Figura 1.5.



Figura 1.5 Hidrogel polimérico a base de un derivado del ácido acrílico: a la izquierda se representa el estado no ionizado, donde se favorecen las interacciones entre los grupos colgantes. Al ocurrir un cambio de pH en el microambiente, el grupo carboxílico se ioniza y se incrementan las repulsiones electrostáticas entre las cadenas (derecha). Modificado de la referencia [21].

1.3 Síntesis de hidrogeles

Las redes poliméricas que conforman los hidrogeles pueden obtenerse a través de diferentes rutas de síntesis, por lo que las propiedades de los polímeros obtenidos están íntimamente relacionadas con el método elegido para su elaboración. Por ejemplo, los hidrogeles porosos con dimensiones de escala macroscópica (macrogeles o *bulk gels*) se sintetizan mediante una reacción de polimerización en solución [8]. En contraste, para obtener el polímero en forma de partículas de escala micrométrica es necesario aplicar agitación durante la polimerización [22]; por otra parte, el tamaño de las partículas se puede reducir a un intervalo de nanómetros si se agrega un agente tensoactivo durante la reacción, lo cual da paso a una polimerización por emulsión [23, 24].

La polimerización por emulsión es una técnica para la síntesis de polímeros que data desde los años veinte y, desde entonces, ha ganado popularidad al permitir la fabricación a nivel industrial de materiales con gran importancia económica como los homopolímeros de acetato de vinilo, cloropreno, tetrafluoroetileno, cloruro de vinilo, así como copolímeros de estireno-butadieno. Todos estos polímeros se producen en millones de toneladas cada año [25] y sus productos se aplican principalmente como pinturas, recubrimientos, adhesivos, así como también en la industria farmacéutica [26].

Una emulsión consiste en un sistema heterogéneo formado por dos líquidos inmiscibles: un líquido (fase dispersa) es dispersado en otro, generalmente de mayor volumen (fase continua). Como todo sistema heterogéneo, resulta ser termodinámicamente inestable al tener una alta energía libre asociada a su gran área superficial. Con el fin de mantener estables las emulsiones a través del tiempo, es necesario agregar un compuesto que permita reducir la energía libre (o tensión interfacial) y que actúe de esta manera como estabilizante de la fase dispersa [27]. Para poder realizar una reacción de polimerización por emulsión se necesitan, como mínimo, los siguientes elementos:

- I. Fase continua: Medio en el cual se dispersarán los demás agentes. Actúa como medio de difusión del monómero y de descomposición para el iniciador; además ayuda a mantener baja la viscosidad del sistema y funciona para disipar el calor generado (la polimerización es un proceso exotérmico). Cuando la fase continua es un compuesto hidrofílico y la dispersa es de naturaleza lipofílica, la emulsión se conoce como aceite en agua (O/W en inglés). Si la naturaleza de las fases se invierte, la emulsión será de agua en aceite (W/O); también conocidas como emulsiones inversas.
- II. Monómero(s): Compuesto bifuncional que conformará la unidad repetitiva del polímero; si se agregan dos monómeros distintos se obtendrá un copolímero. Al incorporar un tercer elemento con funcionalidad de cuatro, se promoverá la formación de una cadena reticulada. Los monómeros deben ser inmiscibles o solubilizarse parcialmente en la fase continua, por lo que éstos tenderán a acumularse formando gotas (fase dispersa).
- III. Iniciador: Sustancia soluble en la fase continua que, con la aplicación de calor o radiación UV, promoverá la generación de radicales libres para comenzar la polimerización. Las sales de peróxido (peróxido de potasio, amonio o sodio) y los hidroperóxidos orgánicos (peróxido de cumeno o benzoilo) son los agentes iniciadores más comúnmente utilizados en este tipo de reacciones, al igual que los compuestos azo (-N=N-).

Por otra parte, algunos compuestos propician la formación de radicales libres al combinarse a través de reacciones de óxido-reducción. Los iniciadores de tipo *redox,* como, por ejemplo, el persulfato de amonio y el bisulfito de sodio, son de particular importancia en aplicaciones a nivel industrial debido a que inducen la polimerización a bajas temperaturas.

IV. Tensoactivos: Compuestos químicos de naturaleza anfifílica, que tienden a adsorberse en la interfase de una emulsión, modificando la tensión superficial entre los líquidos inmiscibles y favoreciendo la estabilidad de la mezcla. Los tensoactivos (también conocidos como surfactantes), forman micelas que, además de impedir la agregación de las cadenas poliméricas en crecimiento durante la polimerización, funcionan como pequeños reactores individuales y aislados, mejorando significativamente la velocidad de polimerización en comparación con las reacciones de polimerización en masa o en solución. Los surfactantes aniónicos (sales de ácidos grasos, sales de ácidos alquil sulfónicos o sales de sulfatos alquil hidrogenados) se emplean comúnmente en polimerizaciones por emulsión. A bajas concentraciones, los tensoactivos se solubilizan libremente en el medio; sin embargo, existe una concentración mínima crítica a partir de la cual se agregarán para formar micelas (CMC), cuyo tamaño y forma estará en función del tipo de tensoactivo.

En una polimerización en emulsión se pueden identificar tres etapas, cada una establecida con base en tres aspectos: la velocidad de polimerización (intervalo I), el cambio en el número de partículas (intervalo II) y la cantidad de micelas y gotas de monómero (intervalo III), tal y como se representa en la Figura 1.6 [28].



Figura 1.6 Evolución de la velocidad de polimerización (dx/dt) y el grado de polimerización (x) durante las tres etapas de una polimerización en emulsión. Adaptado de [27].

En el intervalo I tiene lugar la nucleación de las partículas, la cual consiste en la formación de un macrorradical, posterior al ataque de un radical libre hacia una especie vinílica (monómero o entrecruzante). En esta etapa la cantidad de partículas aumenta rápidamente con el paso del tiempo, al igual que la rapidez de la reacción. Durante el intervalo II se detiene la nucleación y predomina únicamente el crecimiento de las partículas por efecto de la difusión continua del monómero, desde las gotas dispersas en la fase acuosa hacia las cadenas poliméricas crecientes; por lo que la rapidez de polimerización permanecerá constante hasta que se consuman las reservas de monómero.

Finalmente, en el intervalo III, la concentración de monómero decrece con la conversión, al igual que la rapidez de reacción. Como las pequeñas partículas crecientes y estabilizadas con el tensoactivo se encuentran hinchadas con el monómero, es posible que exista un fenómeno de auto aceleración en la velocidad de polimerización como resultado del efecto gel, por lo que se dice que esta etapa de síntesis es similar a la polimerización en masa.

1.4 Antecedentes

Los hidrogeles compuestos por N-isopropil acrilamida (NIPAM) y ácido metacrílico (MAA) han sido utilizados en aplicaciones que van desde la separación de solutos para la remediación de aguas [29] y mecanismos de control en la permeación de membranas [30], hasta la liberación selectiva de fármacos y su uso como sustratos en ingeniería de tejidos [17, 31, 20].

El P(NIPAM) es uno de los polímeros termosensibles más populares ya que su temperatura de solución crítica mínima (LCST) es cercana a 32 °C, lo cual lo hace candidato ideal para aplicaciones en el área de la salud. Debajo de esta temperatura, el polímero se solubiliza en medios acuosos, mientras que, por encima de ella, ocurre un colapso reversible en su estructura causando que el polímero se insolubilice y precipite de la solución. Por su parte, el P(MAA), al ser un polielectrolito, muestra un comportamiento similar al P(NIPAM) cuando existen cambios en el pH del medio circundante, pero a diferencia de la P(NIPAM), esta transición dependerá del grado de ionización del ácido carboxílico presente en su estructura química.

Los hidrogeles inteligentes que han sido diseñados para la liberación de fármacos están compuestos por polímeros hidrosolubles unidos por moléculas que actúen como ligaduras entre las cadenas. Estos compuestos de bajo peso molecular llamados agentes entrecruzantes o reticulantes, permiten la formación de hidrogeles a través de la formación de enlaces covalentes. De esta manera, la estructura generada es capaz de retener en su interior moléculas cuya solubilidad en el medio fisiológico está limitada por su elevado peso molecular, o bien, su baja afinidad al medio acuoso, como es el caso de los péptidos y las proteínas.

En distintas partes del mundo, la investigación sobre estos dos importantes polímeros (PNIPAM y PMAA) ha estado orientada hacia el desarrollo de copolímeros que aprovechen las propiedades de ambos y, de esta manera, obtener nanopartículas con sensibilidad dual para su aplicación como transportadores de fármacos.

Uno de los primeros grupos en reportar la elaboración de estos sistemas fue el de Wu y Lee [32] quienes, a partir de trabajos previos con NIPAM, sintetizaron, mediante polimerización por emulsión, esferas de NIPAM-co-MAA entrecruzadas con BIS y evaluaron sus propiedades de equilibrio en función del contenido de MAA, el pH, la temperatura y la fuerza iónica de las soluciones. Los autores obtuvieron partículas con diámetros nanométricos que variaban según de la proporción de MAA, existiendo una tendencia al incremento de tamaño, con mayor contenido de este monómero. Ellos concluyeron que el cambio de la temperatura a la que ocurre la de transición de volumen depende de la concentración de MAA en la cadena polimérica.

Wu y Zhang [7] sintetizaron partículas de NIPAM-co-MAA mediante emulsión utilizando N'N metilen-bis-acrilamida (BIS) como agente entrecruzante. Posteriormente, dispersaron las nanopartículas en una matriz hidrofóbica con la finalidad de generar membranas que permitieran un control selectivo en la permeación de proteínas. Los autores utilizaron vitamina B12 como modelo de estudio debido a las similitudes en estructura tridimensional y peso molecular con algunos polipéptidos, entre ellos la insulina. Este grupo de trabajo también logró obtener partículas de 480 nm (valor medido a 37 °C en PBS), mediante la modificación de la cantidad de MAA agregada durante la reacción. Interesantemente, las partículas disminuyeron su tamaño a 300 nm al cambiar el pH a 5, efecto que fue más evidente cuando el contenido de MAA fue mayor.

Finalmente, estas partículas fueron incorporadas a una membrana para controlar la difusión de insulina, observando que la rapidez de respuesta de la membrana se incrementa a mayor concentración de MAA, mientras que la permeabilidad de la hormona aumenta hasta 10 veces cuando el pH baja de 7 a 4. Lo anterior sugiere que, bajo esas condiciones de acidez, ocurre el colapso de las partículas embebidas en la matriz, lo cual resulta de gran interés ya que esta condición se produce cuando la glucosa es convertida a ácido glucónico en presencia de la enzima glucosa oxidasa [30].

Rasib y su grupo de trabajo [33] analizaron el efecto que tiene la concentración de MAA, NIPAM y BIS sobre el tamaño de los hidrogeles formados en presencia de quitosano. Los autores evaluaron las tres variables a dos distintos niveles y mediante la realización de un diseño experimental 3², identificaron que el factor que determina el tamaño de las partículas es la cantidad de NIPAM agregada durante la síntesis de los hidrogeles.

Gao y colaboradores [8] trabajaron en la síntesis de hidrogeles inteligentes, a escala macroscópica, utilizando NIPAM como material de termo-respuesta y cuatro monómeros derivados del ácido acrílico, entre ellos el MAA. Los autores caracterizaron la morfología y las propiedades fisicoquímicas de los geles que obtuvieron, además de evaluar el comportamiento de los geles cargados con insulina en fluido intestinal y gástricos simulados. Posteriormente, realizaron la evaluación de la liberación de insulina *in vivo*, utilizando ratas Wistar como modelos de pacientes diabéticos y conejos Nueva Zelanda sanos, para evaluar la concentración de glucosa e insulina, en sangre, respectivamente. Encontraron que la LCST de los geles elaborados con MAA se desplazó a una temperatura mayor en comparación con el homopolímero de PNIPAM; lo anterior está relacionado con la hidrofilicidad del comonómero. También comprobaron que la temperatura a la que ocurre la transición de volumen se modifica al hacerlo el pH del medio. En este estudio no se observó una liberación significativa de insulina en el medio que simula las condiciones estomacales (pH ácido), lo cual sí ocurrió en el medio que simula al intestino delgado (pH alcalino).

El BIS se ha utilizado como agente reticulante al 2%/mol en la preparación de geles de poliacrilamida desarrollados para evaluar la liberación *in vivo* de insulina [9]. La liberación de la hormona se cuantificó hasta por 20 días sin que existiera degradación en los hidrogeles durante el tiempo en que fueron implantados, así como tampoco existieron rastros de glucosuria en las ratas diabéticas, observándose un crecimiento normal en ellas. Además, se ha observado que el grupo metileno presente en el BIS es susceptible a hidrólisis cuando la concentración de entrecruzante es baja, generándose formaldehído como subproducto, por lo que la degradación del hidrogel es controlada mediante la densidad del entrecruzamiento. Cuando el BIS es utilizado a una concentración de 0.3 - 0.6%/mol con respecto al monómero, la degradación del hidrogel ocurre de dos a diez días, mientras que por encima del 1% no se observa degradación en el entrecruzante en el mismo intervalo de tiempo. [34].

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1 Materiales

Se utilizaron los monómeros: N-isopropil acrilamida (NIPAM, 113.16 g/mol) y ácido metacrílico (MAA, 86.10 g/mol), mientras que la N, N'-metilenbisacrilamida (BIS, 154.17 g/mol) fue utilizada como agente entrecruzante. Adicionalmente se empleó dodecilsulfato de sodio (SDS, 288.38 g/mol) como surfactante aniónico. El sistema iniciador de la reacción consistió en persulfato de amonio (APS, 270.24 g/mol) y tetrametil etilendiamina, (TEMED, 116.13 g/mol). Las pruebas de hinchamiento se realizaron en un buffer salino de fosfatos (PBS). Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Missouri, USA), tuvieron una pureza mayor al 99%, y fueron usados directamente del envase sin procesamiento previo alguno, a excepción del MAA, el cual se filtró en una columna pre-empaquetada para remover la hidroquinona monometil éter (MEHQ), sustancia añadida por el proveedor como inhibidor de la polimerización del monómero cuando está almacenado.

2.2 Síntesis de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA).

Para obtener las partículas P(NIPAM-co-MAA) se realizó una polimerización en emulsión iniciada por radicales libres de la siguiente manera [8, 10, 30]: la reacción se llevó a cabo en un matraz de tres bocas; en dos de ellas se colocó un tapón esmerilado sujetado con *parafilm*, mientras que por la tercera se agregaron los compuestos. Primeramente, se disolvió SDS (115.35 mg) en 20 mL de agua destilada y se vertió en el reactor vacío, aplicando agitación magnética controlada. El NIPAM y BIS fueron disueltos por separado en 10 mL de agua destilada y adicionados lentamente al matraz con una pipeta de 10 mL, mientras que el MAA se agregó directamente (sin disolverlo previamente en agua). Seguidamente fueron mezclados con agitación magnética hasta lograr su homogenización.

A continuación, se ajustó el volumen de la fase acuosa a 140 mL, se cerró el sistema con un tapón horadado y se aplicó un flujo constante de nitrógeno durante 25 min para generar una atmósfera inerte. Posteriormente, se agregaron el iniciador (67.5 mg), previamente disuelto en 10 mL de agua destilada, y el catalizador (8 μ L), para dar inicio a la polimerización en un volumen final de 150 mL.

La reacción se mantuvo por 4 h a 70 °C (con ayuda de un baño de aceite) y con agitación magnética constante a 1200 rpm (Cimarec, ThermoScientific). Transcurrido el tiempo de reacción, se retiró el reactor del baño de aceite; el contenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó en recipientes de plástico. En la Figura 2.1 se presenta un esquema del polímero obtenido como resultado de la reacción.



Figura 2.1 Esquema para la síntesis de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS.

Adicionalmente, se realizó la purificación de las emulsiones mediante un sistema de diálisis a través de membranas. Para esto, se recurrió al uso de membranas tubulares de celulosa con peso molecular de corte igual a 12,000 Da (16 x 300 mm, Sigma Aldrich), con el fin de favorecer la difusión de los monómeros residuales que no reaccionaron y eliminar el dodecil sulfato de sodio.

Previo a su uso, las membranas se lavaron con agua destilada a 70 °C, durante 30 h a 600 rpm, para remover el glicerol utilizado como humectante, y se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron aproximadamente 30 mL de cada látex y se usaron ligas de caucho para sellar los extremos de la membrana, evitando fugas del material. Las membranas con las emulsiones se colocaron en un recipiente rectangular de polietileno y como medio dializante se utilizó agua destilada, la cual fue cambiada cada 24 h durante 7 días. Finalmente, el líquido obtenido se almacenó en tubos Falcon de 50 mL a temperatura ambiente.

En la Tabla 2.1 se muestran las formulaciones preparadas en este trabajo; en ella se puede identificar que la cantidad de MAA fue evaluada en 5 niveles, mientras que el agente entrecruzante se utilizó con 4 concentraciones diferentes (expresado como porcentaje respecto a los moles totales de los monómeros). Las cantidades de SDS, APS y TEMED fueron mantenidas constantes en todas las formulaciones preparadas.

BIS	NIPAM/MAA	NIPAM	MAA	BIS	SDS	APS	TEMED
(%)		(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mmol)
	1.0/0.0		0.0	0			
	1.0/0.3		1.5	0			
0	1.0/0.5	5.0	2.5	0	0.4	0.296	0.05
	1.0/0.8		4.0	0			
	1.0/1.0		5.0	0			
	1.0/0.0		0.0	0.150			
	1.0/0.3		1.5	0.195			
3	1.0/0.5	5.0	2.5	0.225	0.4	0.296	0.05
	1.0/0.8		4.0	0.270			
	1.0/1.0		5.0	0.300			
	1.0/0.0		0.0	0.300			
	1.0/0.3		1.5	0.390			
6	1.0/0.5	5.0	2.5	0.450	0.4	0.296	0.05
	1.0/0.8		4.0	0.540			
	1.0/1.0		5.0	0.600			
	1.0/0.0		0.0	0.450			
	1.0/0.3		1.5	0.585			
9	1.0/0.5	5.0	2.5	0.675	0.4	0.296	0.05
	1.0/0.8		4.0	0.810			
	1.0/1.0		5.0	0.900			

Tabla 2.1 Formulaciones de las partículas P(NIPAM-co-MAA) generadas a partir de la variación en la cantidad de MAA y de agente entrecruzante.

2.3 Caracterización de las emulsiones.

2.3.1 Rendimiento de la reacción

El grado de conversión, de monómero a polímero, se obtuvo a través de métodos gravimétricos; para ello se tomó una alícuota de 5 mL de cada emulsión, se depositó en una caja de Petri (puesta a peso constante previamente) y se secó en una estufa de vacío durante 24 h a 60 °C.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de sólidos totales (S_T) suspendidos en cada una de las emulsiones, utilizando la Ecuación 2.1:

$$S_T(g) = \left(\frac{m_{emulsión}}{v_{alicuota}}\right) (V_{emulsión})$$
 Ecuación 2.1

Donde m_{emulsión} es la masa de la emulsión seca (g), v_{alícuota} es el volumen muestreado (mL), y V_{emulsión} es el volumen total de la emulsión obtenida (mL). A partir de los sólidos totales contenidos en las emulsiones, se calculó el grado de conversión, es decir, el porcentaje de los monómeros que fueron convertidos a polímero durante la reacción de polimerización. Para ello, se utilizó la Ecuación 2.2:

$$Conversión (\%) = \left(\frac{S_T - m_{APS} - m_{TEMED} - m_{SDS}}{m_{monómeros} + m_{BIS}}\right) * 100$$
 Ecuación 2.2

Donde S_T representa a los sólidos suspendidos en la emulsión (g); m_{APS} , m_{TEMED} , m_{SDS} representan la cantidad en gramos del iniciador, catalizador y tensoactivo, respectivamente, utilizados durante la polimerización, mientras que $m_{monómeros}$ y m_{BIS} corresponden a la masa de los monómeros y masa del agente entrecruzante, respectivamente, que componen a los hidrogeles. El valor reportado corresponde al promedio y a la desviación estándar obtenida de tres mediciones.

2.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica.

Con el fin de observar las partículas obtenidas en la emulsión, se utilizó la técnica de microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM). Las muestras se prepararon de la siguiente forma: 100 µL de la emulsión se añadieron a un tubo Falcon con 10 mL de agua destilada; posteriormente éste fue colocado en un baño ultrasónico durante 10 min para distribuir homogéneamente las partículas y eliminar las interacciones entre ellas. De la solución anterior, se depositaron 20 µL sobre un sustrato de silicio adherido al porta-muestras y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se realizó el análisis topográfico de las muestras, a temperatura ambiente, en atmósfera de aire, utilizando un AFM Bruker INNOVA en modo *tapping* con una frecuencia de 300 kHz. Se utilizó una sonda con un radio de punta de 8 nm, aplicando un torque de 40 N/m y una frecuencia de escaneo de 0.5 Hz en áreas de 5x5 μ m² seleccionadas aleatoriamente.

2.3.3 Dispersión Dinámica de Luz.

El tamaño de partícula en las emulsiones (d_{DLS}) se midió mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (*Dinamic Light Scattering*, DLS) utilizando un analizador de partículas Nanotrac Wave II; Microtrac. Las muestras se obtuvieron al dispersar aproximadamente 15 gotas de cada emulsión (índice de refracción= 1.49) en 1.5 mL de agua desionizada (índice de refracción=1.333). El análisis de las muestras se llevó a cabo a 25 °C, apegándose a las especificaciones de concentración de muestra mínima necesaria para la operación del equipo y realizando las mediciones por triplicado.

2.4 Caracterización de las partículas en estado sólido

2.4.1 Obtención de las partículas en estado sólido.

Las emulsiones se almacenaron a -25 °C y posteriormente, fueron liofilizadas durante 96 h a -53 °C, y 0.185 bar, con un equipo FreeZone 2.5 Labonco, con la finalidad de eliminar el agua y obtener las partículas deshidratadas.

2.4.2 Evaluación morfológica

La morfología de las partículas P(NIPAM-co-MAA) liofilizadas se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM-7601F (*Field Emission Scanning Electron Microscopy*, FE-SEM) con un voltaje de operación de 2 kV.

Para la preparación de la muestra se colocó una pequeña cantidad del material liofilizado sobre una cinta de carbono montada en un soporte metálico y se recubrió con una ligera capa de oro/paladio durante 30 s para permitir la obtención de las imágenes. La distribución y el tamaño promedio de las partículas (d_{FE-SEM}) se obtuvo a partir de mediciones de 100 elementos, utilizando el software ImageJ ProPlus.
2.4.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros de infrarrojo para cada formulación fueron obtenidos mediante el método de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR, por sus siglas en inglés) utilizando un cristal de germanio, en un espectrómetro Nicolet 8700, ThermoScientific. El análisis se realizó en el intervalo de 4000 a 650 cm⁻¹, promediando 100 barridos, con una resolución de 4 cm⁻¹.

2.4.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (¹H-RMN).

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) utilizando un espectrómetro Varian de 600 MHz. Las muestras se prepararon en viales de vidrio, colocando 12 mg del material dializado y liofilizado y, 0.7 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆, Sigma-Aldrich); ambas sustancias se mezclaron mediante agitación manual hasta solubilizar la muestra. Posteriormente, se filtró la solución utilizando jeringas de 3 mL y algodón estéril y el líquido obtenido fue recolectado en los tubos para resonancia.

2.4.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

Para obtener los termogramas se colocaron 10 mg de las partículas liofilizadas sobre una charola de platino; posteriormente se calentó desde 50 °C hasta 700 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de nitrógeno seco (TGA-7, Perkin Elmer).

2.5 Evaluación de la sensibilidad a cambios de pH y temperatura.

Con el fin de conocer las propiedades de las partículas P(NIPAM-co-MAA) en su estado hidratado, se realizó la medición del tamaño cuando éstas se encontraban en medio acuoso, el cual consistió en buffer salino de fosfatos (PBS, 0.1M; Sigma-Aldrich). El buffer se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se le adicionó estreptomicina/penicilina al 1% como antibiótico-antimicótico para preservar las soluciones.

Esta solución fue divida en cuatro alícuotas y a cada una de ellas se les ajustó el pH a diferentes valores (4, 5, 6 y 7.4) utilizando HCl 0.1 M y/o NaOH 0.1 M. Finalmente, las preparaciones se filtraron para remover sólidos y se almacenaron en recipientes de polipropileno a 4 °C hasta su uso.

Las partículas dializadas y liofilizadas se pesaron y colocaron en viales Falcon de 15 mL, se hidrataron con el volumen necesario de buffer para obtener una concentración de 1 mg/mL, se dejaron estabilizar durante 24 h para asegurar el hinchamiento de la muestra y, previamente a su uso, se sonicaron durante 5 min para evitar la formación de agregados.

El tamaño de los hidrogeles se midió mediante Dispersión Dinámica de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). El agua destilada en la celda fue reemplazada por el PBS con el pH correspondiente para realizar las mediciones (índice de refracción= 1.335). Se utilizó un tiempo de análisis de 180 s por lectura, realizando tres para cada una de las muestras, a las diferentes condiciones de pH y a temperatura de 25 °C. Por otra parte, la influencia de la temperatura se evaluó al realizar las mediciones en condiciones de temperatura similares a las fisiológicas. Las muestras con partículas P(NIPAM-co-MAA) y las soluciones buffer se colocaron en baño María para mantener la temperatura a 37 °C. El líquido de la celda se reemplazó por la muestra correspondiente y se dejó estabilizar la muestra durante 1 min. Finalmente, los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, pero a una temperatura de 37 °C.

Posteriormente el hinchamiento de los hidrogeles se determinó utilizando la Ecuación 2.3:

$$Hinchamiento (\%) = \frac{d_{DLS} - d_{FE-SEM}}{d_{FE-SEM}} * 100$$
 Ecuación 2.3

En donde d_{FE-SEM} representa el tamaño de las partículas en su estado deshidratado y dDLS consiste en el tamaño de los hidrogeles en solución al pH y temperatura indicado.

2.6 Caracterización biológica

2.6.1 Ensayo de hemólisis.

La interacción entre los eritrocitos y las partículas P(NIPAM-co-MAA) se analizó mediante un ensayo de hemólisis de acuerdo a la norma ISO 10993-4. Las muestras de sangre se recolectaron de donadores voluntarios sanos utilizando tubos Vacutainer (7.2 mg K2 EDTA, Becton Dickinson). Los experimentos se realizaron por triplicado y utilizando nanopartículas P(NIPAM-co-MAA) dializadas y liofilizadas, las cuales fueron previamente esterilizadas mediante exposición a radiación UV durante 15 min.

Para cada experimento se utilizó 1 mg de muestra, se puso en contacto con 1 mL de una solución salina de eritrocitos al 5% v/v y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Las soluciones se centrifugaron durante 10 min, a 1500 rpm, y 20 °C (Scientific Centurion); posteriormente, del sobrenadante se tomaron 10 µL, se colocaron en una placa de 96 pozos y enseguida se agregaron 100 µL de solución salina. La hemoglobina liberada de los eritrocitos se cuantificó al medir la absorbancia a λ =415 nm en un lector de microplacas (Cytation 3, BioTek Instruments Inc.). El porcentaje de hemólisis se calculó usando la Ecuación 2.4:

$$Hem \acute{o}lisis (\%): \frac{Abs_{exp} - \overline{Abs}_{C^{-}}}{\overline{Abs}_{C^{+}} - \overline{Abs}_{C^{-}}} * 100 \qquad \qquad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde Abs_{exp} indica el valor de la absorbancia medido en cada experimento, \overline{Abs}_{C+} representa el valor promedio del control positivo (agua destilada) mientras que \overline{Abs}_{C-} corresponde al promedio de la absorbancia medida al control negativo (solución salina).

2.6.2 Cultivo celular

Se realizó un ensayo de proliferación celular con la finalidad de evaluar el efecto que tienen los nanogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS al 6%, sobre la morfología y la viabilidad de células endoteliales provenientes de una aorta bovina (BAOEC, Cell Applications Inc).

Como las nanopartículas P(NIPAM-co-MAA) dializadas se obtuvieron en forma de polvo después de la liofilización, se optó por la preparación de medios de cultivo que las contuvieran y se realizó un ensayo de proliferación celular bajo la metodología de medio condicionado, tal y como lo dicta la norma ISO 10993-5.

2.6.2.1 Elaboración de medios condicionados.

Para la preparación de los medios acondicionados con nanopartículas dializadas y liofilizadas, se colocaron 10 mg de cada formulación en tubos Falcon de 50 mL y éstos fueron expuestos durante 15 min a radiación UV para asegurar esterilidad. Posteriormente se añadieron 5 mL de medio de cultivo para el crecimiento de células endoteliales de aorta bovina (BAOEC, Cell Applications Inc), complementado con 10% de suero fetal bovino y 1% estreptomicina-penicilina, y se dejó reposar durante 24 h a 4 °C para asegurar el hinchamiento de los nanogeles. Transcurrido el tiempo indicado, se obtuvieron alícuotas de 1 mL de cada muestra y se diluyeron con el volumen necesario de medio de cultivo para obtener una concentración final de 0.5 y 1 mg/mL.

2.6.2.2 Proliferación de células endoteliales (BAOEC).

Se sembraron aproximadamente 10 000 células (15 μ L de suspensión celular) en placas de poliestireno con 96 pozos. Se añadieron 35 μ L de medio de cultivo complementado (10% de suero bovino fetal y 1% estreptomicina-penicilina) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, durante 24 h, para asegurar la adhesión a la placa de cultivo. Posterior al tiempo indicado, el medio de cultivo se reemplazó con 50 μ L de medio combinado con las nanopartículas P(NIPAM-co-MAA) y se incubaron a distintos tiempos (24, 48 y 72 h).

Adicionalmente, se cultivaron células únicamente con medio de cultivo para utilizarlas como control positivo, mientras que, como control negativo, al cultivo se añadió agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) al 5%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, para cada muestra, en cada una de las concentraciones.

La viabilidad de las células endoteliales se evaluó a 24, 48 y 72 h mediante un ensayo colorimétrico utilizando CellTiter Blue (Promega). Para esto, a cada uno de los pozos sembrados se le agregaron 10 μ L del colorante y se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente se midió la absorbancia a una λ = 570 nm en un lector de placas (Cytation 3, BioTek Instruments).

El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando la Ecuación 2.5

$$Viabilidad (\%): \frac{Abs_{exp} - \overline{Abs}_{C+}}{\overline{Abs}_{C-} - \overline{Abs}_{C+}} * 100$$
 Ecuación 2.5

Donde Abs_{exp} indica el valor de la absorbancia medido en cada experimento, \overline{Abs}_{C+} representa el valor promedio del control positivo, mientras que \overline{Abs}_{C-} corresponde al promedio de la absorbancia medida al control negativo.

2.6.2.3 Morfología mediante tinción violeta

La morfología que adoptaron las células endoteliales después de ser cultivadas en presencia de nanogeles a base de NIPAM y MAA, entrecruzados con 6% de BIS, se observó mediante tinción con cristal violeta. Para ello, se removió el medio de cultivo de los pozos y se lavaron con 100 µL de PBS; luego, se agregaron 50 µL del agente de tinción (KaryoMax Gimsa Stain, Gibco) y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron al menos 6 lavados, con 100 µL de PBS cada uno, para remover el tinte excedente. Finalmente, las células se observaron a una amplificación 10x en un microscopio óptico invertido (TCM 400, Labomed) acoplado a una cámara digital (iVu 5000, Labomed).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto del contenido de BIS (agente entrecruzante) sobre las propiedades de nanopartículas P(NIPAM-co-MAA).

3.1.1 Caracterización de las emulsiones.

3.1.1.1 Síntesis de los copolímeros.

Las reacciones de polimerización que se realizaron para este trabajo consistieron, en su mayoría, en sistemas ternarios NIPAM/MAA/BIS; sin embargo, también se sintetizaron sistemas binarios: las partículas libres de MAA, correspondiendo al par NIPAM/BIS; así como el grupo BIS 0%, el cual fue sintetizado libre de agente entrecruzante (NIPAM/MAA). Para cada par de monómeros se estimaron las relaciones de reactividad r_1/r_2) utilizando el esquema Alfrey-Price a partir de los valores *Q* (parámetro de resonancia) y *e* (parámetro electrónico) tomados de la literatura [35] y la información obtenida se presenta en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Coeficientes Alfrey-Price de los monómeros NIPAM, MAA y BIS, así como las razones de reactividad calculadas para cada par de monómeros calculados a partir de la Referencia [34].

Monómero	Q	е	Sistema	r ₁ / r ₂
BIS	0.46	0.54	BIS/NIPAM	2.064/0.479
NIPAM	0.21	0.43	BIS/MAA	0.400/1.401
MAA	1.73	1.3	NIPAM/MAA	0.176/2.659

Hoeare y McLean reportaron que existe una correlación entre la distribución de los comonómeros a lo largo de las partículas y su cinética de copolimerización, en microgeles a base de NIPAM: los monómeros de menor reactividad (respecto al NIPAM) están preferencialmente distribuidos en la superficie. Esta afirmación también tiene validez para el BIS, compuesto ampliamente utilizado como agente entrecruzante en estos sistemas, ya que se ha sugerido que el entrecruzante se ubica principalmente al centro de las partículas puesto que reacciona más rápido que la NIPAM [36].

En los sistemas BIS/NIPAM se puede esperar la formación de un copolímero aleatorio con porciones de BIS más grandes, que forman estructuras con un núcleo denso y más reticulado, mientras que en la periferia se encuentran las cadenas poliméricas de P(NIPAM) con una densidad de entrecruzamiento menor. Algo similar ocurre en las emulsiones libres de agente entrecruzante (BIS 0%). En este caso, el monómero ácido es consumido más rápidamente durante la síntesis de las partículas, por lo que el crecimiento de las cadenas poliméricas favorece la propagación de este monómero; esto causa que las partículas obtenidas presenten una estructura rica en MAA en el centro y que el NIPAM se encuentre mayormente distribuido en la periferia, como se ha reportado por distintos grupos de trabajo utilizando diferentes tipos de microscopía, en sistemas nano y micrométricos [35, 37, 24, 23].

3.1.1.2 Aspecto de las emulsiones.

En la Figura 3.1 se muestra la apariencia de las emulsiones obtenidas en este trabajo, una vez que las emulsiones alcanzaron la temperatura ambiente. Es interesante notar que aquellas que contienen únicamente P(NIPAM) son transparentes, independientemente de la cantidad de BIS utilizado durante la síntesis, en contraste con las emulsiones de los copolímeros que presentan una coloración blanquecina.



1.0/0.0 1.0/0.3 1.0/0.5 1.0/0.8 1.0/1.0 1.0/0.0 1.0/0.3 1.0/0.5 1.0/0.8 1.0/1.0 Figura 3.1 Apariencia de las emulsiones de P(NIPAM-co-MAA) obtenidos mediante síntesis por emulsión variando la cantidad de agente entrecruzante: a) BIS 0%, b) BIS 3%, c) BIS 6% y d) BIS 9%.

Interesantemente, las formulaciones sin entrecruzar (BIS 0%), así como las ligeramente entrecruzadas (BIS 3%) se muestran como soluciones opalescentes y ligeramente traslúcidas; lo anterior es un indicador visual de que las partículas sintetizadas con menor concentración del agente entrecruzante fueron obtenidas con un diámetro menor que sus análogas más reticuladas.

3.1.1.3 Rendimiento de reacción.

En la Tabla 3.2 se muestran los valores de conversión (rendimiento) obtenidos para todas las reacciones de polimerización llevadas a cabo en este trabajo. Se puede notar que el rendimiento de las reacciones de polimerización fue elevado en todos los casos, reportando un valor mínimo de conversión del 90%; lo anterior, demuestra que la mayoría del monómero se convirtió a polímero durante la reacción. También es importante mencionar que no hay una relación clara entre el rendimiento de la reacción y la relación de monómeros NIPAM/MAA, ni entre su rendimiento y el contenido del agente entrecruzante.

ΝΙΡΑΜ/ΜΑΑ		()		
	0	3	6	9
1.0/0.0	97.3 ± 1.7	95.0 ± 0.5	97.0 ± 3.6	95.1 ± 2.9
1.0/0.3	94.0 ± 1.8	93.3 ± 2.8	94.6 ± 6.6	94.0 ± 3.7
1.0/0.5	92.8 ± 2.7	92.9 ± 1.7	96.3 ± 2.3	90.0 ± 1.7
1.0/0.8	93.7 ± 3.3	90.1 ± 3.7	96.3 ± 1.5	92.0 ± 2.6
1.0/1.0	92.3 ± 4.3	96.5 ± 1.4	92.0 ± 1.7	91.0 ± 1.5

Tabla 3.2 Rendimiento de la reacción de las partículas P(NIPAM-co-MAA) con diferente cantidad de agente entrecruzante.

BIS (%)

3.1.1.4 Tamaño de las partículas.

Con base en la apariencia de las emulsiones, y su interacción con la luz, se asume que de la reacción de polimerización se obtienen productos de escala nanométrica. Debido a lo anterior, el tamaño de las partículas P(NIPAM-co-MAA) suspendidas en la emulsión se midió mediante DLS y la información obtenida se presenta en la Figura 3.2.

Resulta interesante observar que, como tendencia general, a medida que se aumenta la concentración del agente entrecruzante, el tamaño de la partícula también lo hace, concordando con lo reportado en trabajos previos [38, 39].



Figura 3.2 Tamaño de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con diferentes cantidades de BIS.

Este efecto en el diámetro de las partículas puede ser descrito a partir del mecanismo de nucleación de las partículas, así como su posterior crecimiento durante la síntesis de P(NIPAM-co-MAA). La reactividad del BIS acelera la formación de radicales primarios al inicio de la polimerización, generando un incremento en el peso molecular de las cadenas en crecimiento por cada molécula de entrecruzante que es incorporada durante esta etapa; es por eso que al tener un gran número de cadenas poliméricas crecientes con "elevada" masa molecular, resulta posible que en algún momento de la reacción, éstas se combinen para mantener la estabilidad en la solución, lo que conduciría a un aumento en el tamaño de la partícula al finalizar la reacción. Basados en esta consideración, se puede establecer que el contenido de BIS se relaciona de manera directamente proporcional con el tamaño de las partículas P(NIPAM-co-MAA). Ante esto se ha sugerido la existencia de una concentración limitante de este compuesto para evitar la coagulación durante la polimerización [39].

- 3.1.2 Caracterización de las partículas en estado sólido.
- 3.1.2.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros de infrarrojo obtenidos para las partículas P(NIPAM-co-MAA) con diferentes cantidades de BIS son presentados en la Figura 3.3. Las señales ubicadas en 3428, 3295 y 3075 cm⁻¹ están relacionadas con los estiramientos del enlace N-H de las aminas secundarias presentes en la NIPAM, mientras que aquellas en 2972, 2929, 2878 y 2857 cm⁻¹ son asignadas a los estiramientos C-H asimétricos y simétricos de metilos y metilenos presentes en la cadena principal. El pico localizado en 1629 cm⁻¹ pertenece al estiramiento del enlace C=O, conocido como amida I; mientras que la señal en 1543 cm⁻¹ se debe al estiramiento del enlace C-N y la deformación del enlace N-H (amida II); mientras que en 1387 y 1367 cm⁻¹ se observa el estiramiento del grupo isopropil, característico del P(NIPAM) [40]. Estas señales no presentaron desplazamientos significativos en la posición de los picos identificados al modificar la cantidad de agente entrecruzante.



Figura 3.3 Espectros FTIR de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con BIS a las diferentes concentraciones.

3.1.2.2 Resonancia Magnética Nuclear

La Figura 3.4 muestra los espectros de resonancia magnética nuclear de protón obtenido de las nanopartículas P(NIPAM-co-MAA) con una relación de monómeros 1.0/1.0 y diferente contenido de BIS; adicionalmente se realizó el análisis del homopolímero lineal de NIPAM (1.0/0.0 - BIS 0%) para contrastar los resultados. En el espectro del homopolímero del NIPAM, se identifica la señal **e**, asignada a los protones de los metilos del isopropilo en 1.00 ppm, mientras que los protones de los grupos metinos y metilenos de la cadena hidrocarbonada aparecen en 1.20 y 1.42 ppm (señales **a** y **b**, respectivamente). El pico **d**, ubicado en 3.80 ppm, está relacionado con el protón metino presente en el grupo isopropilo del NIPAM, mientras que la señal **c**, amplia y poco intensa que se encontró en 7.15 ppm, es debida al protón de la amina secundaria que se encuentra en la NIPAM [40, 41].



Figura 3.4 Espectros 1H-RMN de las nanopartículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzado con diferentes cantidades de BIS y P(NIPAM) no entrecruzado.

Por otra parte, claramente se puede observar cómo la intensidad de las señales, en los espectros correspondientes a los copolímeros, disminuye al incrementarse el contenido de BIS. Este fenómeno resulta más evidente en las señales **f** y **g**, asignadas al MAA (la debida a los protones del metilo sustituyente en 0.88 ppm y el pico producido por el protón del ácido carboxílico que se manifestó en 12.1 ppm), las cuales se reducen hasta ser prácticamente imperceptibles en los polímeros más reticulados.

3.1.2.3 Análisis Termogravimétrico

En la Figura 3.5 se muestran los termogramas de la primera derivada de las curvas termogravimétricas (DTGA) obtenidas de las partículas sintetizadas; en ellos, es posible identificar que el contenido de BIS utilizado como agente entrecruzante tiende a modificar la estabilidad térmica de las partículas (se reduce a medida que la cantidad de BIS se incrementa).

En el caso de las partículas de P(NIPAM), la descomposición ocurre en una sola etapa independientemente de la cantidad de agente entrecruzante, a excepción de las partículas entrecruzadas con BIS al 6%, donde se identifica que este proceso degradativo ocurre en dos etapas. Este comportamiento observado es diferente a lo reportado previamente [42], por lo que resulta adecuado realizar un análisis a detalle de las formulaciones entrecruzadas con BIS 6% para identificar este fenómeno.





Figura 3.5 Primera derivada de los termogramas (DTGA) de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con BIS.

3.1.3 Caracterización de los hidrogeles: sensibilidad a estímulos.

3.1.3.1 Sensibilidad al pH

El tamaño en solución de los hidrogeles formados por las partículas de P(NIPAMco-MAA) hidratadas en PBS, fue medido mediante DLS, a diferentes valores de pH, y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.3. La selección de un buffer salino como medio dispersante se realizó con la finalidad de mantener constante la fuerza iónica, ya que se ha reportado que la concentración y/o tipo de sal presente en el medio influye sobre las transiciones de volumen en hidrogeles con grupos funcionales ionizables, como es el caso del ácido metacrílico [43]. La temperatura a la cual se llevaron a cabo las mediciones se mantuvo constante a 25 °C para evitar la transición de volumen debido a este parámetro.

Tabla 3.3 Efecto del pH sobre el tamaño d	de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA)) en PBS a 25 °C.
-------------------------------------------	-----------------------------------	-------------------

% BIS		рН				
/0 013		4	5	6	7.4	
	1.0/0.0	*	9 ± 4	14 ± 2	16 ± 3	
	1.0/0.3	*	211 ± 10	265 ± 7	264 ± 8	
0	1.0/0.5	*	225 ± 11	237 ± 22	261 ± 10	
	1.0/0.8	*	129 ± 22	183 ± 20	177 ± 30	
	1.0/1.0	*	31 ± 7	24 ± 1	30 ± 2	
3	1.0/0.0	23 ± 2	22 ± 5	17 ± 2	17 ± 1	

Tamaño (nm)

$1.0/0.5$ 95 ± 4 160 ± 4 199 ± 2 205 ± 16 $1.0/0.8$ 75 ± 2 146 ± 15 154 ± 5 173 ± 7 $1.0/1.0$ 53 ± 7 89 ± 8 118 ± 5 118 ± 9	
1.0/0.8 75 ± 2 146 ± 15 154 ± 5 173 ± 7 1.0/1.0 53 ± 7 89 ± 8 118 ± 5 118 ± 9	
1.0/1.0 53 ± 7 89 ± 8 118 ± 5 118 ± 9	
1.0/0.0 103 ± 4 169 ± 4 184 ± 5 187 ± 4	
1.0/0.3 165 ± 2 284 ± 2 240 ± 2 320 ± 14	
6 1.0/0.5 103 ± 3 150 ± 4 159 ± 6 168 ± 8	
1.0/0.8 81 ± 0 132 ± 3 143 ± 7 159 ± 4	
1.0/1.0 63 ± 1 100 ± 3 115 ± 4 138 ± 2	
1.0/0.0 16 ± 2 19 ± 2 15 ± 1 20 ± 2	
1.0/0.3 198 ± 14 260 ± 2 241 ± 25 288 ± 11	
9 1.0/0.5 175 ± 13 244 ± 5 258 ± 17 258 ± 5	
1.0/0.8 103 ± 13 143 ± 8 165 ± 5 170 ± 23	
1.0/1.0 129 ± 24 184 ± 11 219 ± 13 182 ± 14	

*: La muestra formó aglomerados y éstos precipitaron impidiendo la medición.

De forma general, resulta posible identificar que el tamaño de las partículas P(NIPAM-co-MAA) tiende a incrementarse al aumentar el pH del medio en el que se encuentran hidratadas. Este fenómeno observado es independiente de la cantidad de BIS que se utilizó en la formulación; por el contrario, al incrementar la cantidad de ácido metacrílico, el tamaño de las partículas tiende a disminuir, en concordancia con las mediciones realizadas a las emulsiones (apartado 3.1.1.4, Figura 3.3).

A pH \leq 4, se suprime la ionización de los grupos carboxílicos del MAA, lo que ocasiona que el hidrogel pierda su carácter polielectrolítico, dando lugar a la contracción de la partícula; lo anterior es debido a que existe la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos colgantes adyacentes. Adicionalmente, se debe considerar la contribución de las interacciones entre las porciones hidrofóbicas de la cadena polimérica sobre las transiciones de volumen. Cuando se incrementa el pH (5 y 6) hacia valores cercanos a la pKa del PMAA, la ionización de los grupos carboxílicos aumenta y, en consecuencia, las cadenas se repelen por efecto de cargas, lo cual se traduce en un incremento significativo en el tamaño de las partículas. Finalmente, bajo condiciones similares al pH fisiológico (7.4), el grupo carboxílico se encuentra totalmente ionizado, actuando como polielectrolito, por lo que se obtiene el hinchamiento máximo debido a la repulsión electrostática entre los grupos cargados negativamente [7].

3.1.3.2 Sensibilidad a la temperatura.

En la Tabla 3.4 se presentan las mediciones del tamaño de las partículas P(NIPAMco-MAA) realizadas a 37 °C. Esta temperatura se eligió ya que además de ser la temperatura intracorpórea, se encuentra por encima de la temperatura de solución crítica mínima del homopolímero de NIPAM reportada en 32 °C [18]. Es interesante notar que, aún con el incremento en la temperatura de la solución, los hidrogeles mantienen la sensibilidad al pH observada a temperatura ambiente; sin embargo, es posible identificar un aumento en el tamaño de las partículas en comparación con las mediciones realizadas a 25 °C, efecto contrario al reportado para microgeles basados en NIPAM [13, 43].

Lo anterior podría ser un indicativo de que la LCST de los polímeros sintetizados en este trabajo se encuentra por encima de la temperatura a la que fue realizada la medición (sin embargo, esta propiedad no ha sido caracterizada) o bien, al ocurrir el colapso de la estructura polimérica, las partículas formaron agregados durante la medición, siendo los causantes de estos resultados. Esto último es soportado por el hecho de que el tamaño de las partículas en el copolímero 1.0/1.0 a pH 4 no pudo ser obtenido siguiendo la metodología descrita previamente ya que la muestra presentó agregación de los nanogeles formando una masa viscosa dentro de la celda del equipo.

			Tamañ	io (nm)	
% BIS		рН			
		4	5	6	7.4
	1.0/0.0	**	*	*	*
	1.0/0.3	**	203 ± 29	292 ± 30	190 ± 10
0	1.0/0.5	**	134 ± 5	145 ± 34	219 ± 15
	1.0/0.8	**	80 ± 5	195 ± 47	202 ± 31
	1.0/1.0	**	21 ± 9	34 ± 10	85 ± 14
	1.0/0.0	**	*	*	*
	1.0/0.3	**	185 ± 7	236 ± 6	262 ± 9
3	1.0/0.5	**	166 ± 6	212 ± 13	231 ± 6
	1.0/0.8	**	142 ± 5	170 ± 4	193 ± 10
	1.0/1.0	**	92 ± 6	140 ± 15	126 ± 6

Tabla 3.4 Efecto del pH sobre el tamaño de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA) en PBS a 37 °C.

$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$							
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1.0/0.0	95 ± 2	195 ± 4	186 ± 5	199 ± 6	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1.0/0.3	122 ± 2	290 ± 8	283 ± 14	315 ± 11	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	6	1.0/0.5	104 ± 5	126 ± 4	171 ± 8	188 ± 7	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1.0/0.8	84 ± 8	158 ± 6	170 ± 10	161 ± 14	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1.0/1.0	**	100 ± 7	121 ± 6	141 ± 12	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1.0/0.0	**	*	*	*	
9 1.0/0.5 ** 247 ± 15 272 ± 11 286 ± 20 1.0/0.8 ** 144 ± 4 191 ± 9 201 ± 11 1.0/1.0 ** 171 ± 14 221 ± 23 216 ± 7		1.0/0.3	**	267 ± 6	270 ± 18	298 ± 12	
1.0/0.8**144 ± 4191 ± 9201 ± 111.0/1.0**171 ± 14221 ± 23216 ± 7	9	1.0/0.5	**	247 ± 15	272 ± 11	286 ± 20	
1.0/1.0 ** 171 ± 14 221 ± 23 216 ± 7		1.0/0.8	**	144 ± 4	191 ± 9	201 ± 11	
		1.0/1.0	**	171 ± 14	221 ± 23	216 ± 7	

*: No se alcanzó la concentración mínima necesaria indicada por el equipo para poder realizar la medición. **: La muestra formó aglomerados y éstos precipitaron impidiendo la medición.

3.1.4 Caracterización biológica

3.1.4.1 Hemólisis

La hemólisis de los eritrocitos consiste en la ruptura de estas células sanguíneas causada por la difusión de agua hacia el interior de la célula cuando ésta se encuentra en un ambiente con una concentración menor de sales, en comparación con el interior de las células. Cuando ocurre la ruptura de los glóbulos rojos, la hemoglobina liberada genera un cambio en la coloración de la solución, tiñéndola de color rojizo. A través del ensayo de hemólisis se cuantifica la hemoglobina liberada, tomando como referencia los valores de absorbancia medidos en los controles (sustancias que inducen o no la lisis de los glóbulos rojos). De esta manera es posible determinar si los materiales evaluados causan reacciones adversas al ponerlos en contacto con el componente sanguíneo [44].

En la Figura 3.6 se identifican fundamentalmente dos elementos: un sobrenadante y un precipitado (conformado por los glóbulos rojos). Como control positivo (C+) se utilizó agua destilada, para favorecer el hinchamiento de los eritrocitos y su consecuente destrucción, por lo que la hemoglobina se libera al medio tiñendo de rojo la solución, mientras que en fondo se aprecian las células vacías. Por el contrario, en el control negativo (C-), el color del sobrenadante es transparente, al mismo tiempo que el botón celular permanece intacto en el fondo, evidenciando que la solución salina isotónica no genera la ruptura de estas células sanguíneas.



Figura 3.6 Interacción de las nanopartículas P(NIPAM) y P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con diferentes cantidades de BIS con sangre.

Como puede observarse en la Figura 3.7 las partículas de P(NIPAM) causan la ruptura de los glóbulos rojos en menos del 1%, independientemente de la cantidad de BIS utilizada durante la reacción de polimerización. Lo anterior indica que estos materiales pueden ser categorizados como materiales no hemolíticos [45], según la norma ISO 10993-4. Por otra parte, el porcentaje de hemólisis en los copolímeros NIPAM/MAA 1.0/1.0 presentó un comportamiento interesante: al aumentar el porcentaje de agente entrecruzante, la hemólisis aumenta del 3 al 6% para las partículas entrecruzadas con BIS al 0 y 3%, respectivamente; sin embargo, cuando el contenido del agente entrecruzante supera este valor (3%), el porcentaje de hemólisis se reduce hasta alcanzar niveles seguros (<5%).



Figura 3.7 Hemólisis asociada a la cantidad de BIS como agente entrecruzante en partículas P(NIPAM) y P(NIPAM-co-MAA).

Con base en estos resultados, es razonable suponer que la actividad hemolítica pueda estar relacionada con interacciones entre la membrana celular de los eritrocitos y los nanogeles, específicamente con los grupos carboxílicos que se incorporaron a los copolímeros, ya que cuando las partículas no tienen MAA la hemólisis es nula, y cuando este comonómero es incorporado, este parámetro aumenta. También es posible observar que el BIS desempeña un papel como posible mediador de esta respuesta, puesto que, en estos polímeros, los grupos COOH se encuentran mayormente localizados hacia el centro de las nanopartículas por efecto de la diferencia de reactividad entre este monómero y el entrecruzante, tal como se discutió en los primeros apartados.

3.2 Efecto de la concentración de ácido metacrílico en las nanopartículas de P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con BIS 6%.

Con base en los resultados obtenidos previamente (sección 3.1), en donde se realizó un estudio preliminar de las propiedades de los hidrogeles obtenidos a partir de copolímeros NIPAM/MAA entrecruzados con BIS a diferentes concentraciones, se decidió profundizar en el estudio del sistema entrecruzado con BIS 6%, para evidenciar el efecto del contenido de monómero ácido sobre las propiedades anteriormente mencionadas.

La elección de este grupo de formulaciones como modelo de estudio, se debe a que estas partículas exhibieron un tamaño que se encuentra en un intervalo adecuado para su uso como sistemas acarreadores de fármacos, aún con la variación del pH en el medio; además de haber mostrado propiedades de hemocompatibilidad interesantes, a diferencia de sus análogos entrecruzados con BIS 0% y BIS 3% donde se comprobó la ruptura de eritrocitos mediante el ensayo de hemólisis. Por otra parte, el grupo BIS 9% fue descartado a pesar de causar el menor daño a los eritrocitos, puesto que estas partículas exhibieron los tamaños más grandes, lo cual podría comprometer el desempeño de estos sistemas como transportador de fármacos.

Con esto en mente, se realizó la caracterización de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% para estudiar la influencia del contenido del comonómero MAA sobre las propiedades de los hidrogeles que forman, por lo cual, además de la caracterización fisicoquímica, morfológica, y de hemocompatibilidad, se realizó un cultivo *in vitro* utilizando células endoteliales como modelo de estudio.

3.2.1 Caracterización de las emulsiones.

3.2.1.1 Aspecto y tamaño de partícula.

La emulsión del homopolímero libre de MAA es transparente a temperatura ambiente (25 °C), como se observa en la Figura 3.8, aunque conviene señalar que, al término de la síntesis de estas muestras, las emulsiones se observaron opacos; es decir, cuando la temperatura descendió hasta alcanzar la ambiente, las emulsiones perdieron el color hasta quedar transparentes, indicando que la transición de volumen únicamente está en función de la temperatura, tal y como se ilustra en la Figura 3.8. Lo anterior es debido a que los grupos polares presentes en la cadena polimérica del P(NIPAM), forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, mejorando su solubilidad, y a su vez, el hinchamiento de los geles. Es por esto que, al incidir la luz sobre estas partículas, ésta no es dispersada, en virtud de que las partículas P(NIPAM)-BIS 6% en su estado hidratado muestran ser iso-refractivas con el agua.



Figura 3.8 Influencia de la temperatura en el aspecto de las emulsiones de P(NIPAM)-BIS 6% y su relación con la transición de volumen de las partículas suspendidas.

La Figura 3.9 muestra las emulsiones obtenidas cuando alcanzaron la temperatura ambiente, después de haber finalizado la reacción de polimerización. Al realizar una inspección visual de las emulsiones, se identifica un cambio en la tonalidad de las muestras según se disminuye la relación NIPAM/MAA, hasta llegar a una solución transparente cuando el monómero ácido está ausente. El cambio en la coloración de las emulsiones sugiere la presencia de nanopartículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% en la fase acuosa.

La luz que atraviesa al líquido es dispersada por las partículas que se encuentran suspendidas en un estado "parcialmente insoluble", esto debido a la transición de volumen que los copolímeros experimentan porque la emulsión está a un pH inferior al de la ionización de los grupos carboxílicos del PMAA (ver Tabla 3.5).



1.0/1.0 1.0/0.8 1.0/0.5 1.0/0.3 1.0/0.0 Figura 3.9 Emulsiones P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% obtenidos mediante polimerización por emulsión.

Tabla 3.5 Tamaño de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS6%, rendimiento de la reacción y pH de las emulsiones

NIPAM/MAA	Rendimiento (%)	Tamaño (nm)	рН
 1.0/0.0	97.0 ± 3.6	14 ± 1	2.87
1.0/0.3	94.6 ± 6.6	233 ± 17	2.90
1.0/0.5	96.3 ± 2.3	182 ± 2	2.90
1.0/0.8	96.3 ± 1.5	163 ± 2	2.99
1.0/1.0	92.0 ± 1.7	92 ± 4	2.81

Como el grupo carboxílico del ácido metacrílico es capaz de aceptar protones en condiciones de pH inferiores a su pKa, (4.25 para el PMAA [16]), se favorece un cambio eléctrico en la carga neta del sustituyente; por lo que los grupos COOH se encuentran ionizados en el medio y forman puentes de hidrógeno entre sí, favoreciendo que las cadenas poliméricas adopten una conformación más compacta.

Del mismo modo, es notoria la existencia de una tendencia a la disminución en el tamaño de las partículas conforme se incrementa la relación NIPAM/MAA, indicando que la incorporación de un monómero hidrofílico en los copolímeros, como el ácido metacrílico, mejora la interacción con las moléculas de agua mientras que el grado de polimerización se reduce, limitando el crecimiento de la partícula [46].

3.2.1.2 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

La Figura 3.10 corresponde a las micrografías obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica de las emulsiones entrecruzadas con BIS al 6% para apreciar la influencia de la cantidad de MAA sobre la morfología de las partículas obtenidas. Es posible identificar que en los hidrogeles parcialmente deshidratados ocurre la formación de agregados de partículas esféricas (tres o cuatro elementos unidos aparentando una partícula de microgel de mayor tamaño), independientemente de la presencia o ausencia del monómero ácido en su composición, dificultando la visualización partículas individuales utilizando esta técnica [47].



Figura 3.10 Micrografías AFM de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%.

- 3.2.2 Caracterización de las partículas en estado sólido.
- 3.2.2.1 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

Se analizó la morfología de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con 6% de BIS en su estado deshidratado. En las micrografías obtenidas por FE-SEM, presentadas en la Figura 3.11, se puede observar claramente que las partículas de los copolímeros NIPAM-MAA tienen un tamaño uniforme, el cual disminuye al incrementar la concentración de MAA. También puede apreciarse una geometría predominantemente esférica, la cual se ve comprometida sutilmente al incrementar la cantidad de MAA; a pesar de lo anterior, la distribución de tamaños es estrecha.



Figura 3.11 Micrografías FE-SEM de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% donde se observa la morfología, la distribución de tamaño y tamaño promedio.

Por el contrario, en las partículas de NIPAM sin MAA (NIPAM/MAA 1.0/0.0) se identifican estructuras cuya morfología se asemeja a gránulos irregulares, en lugar de esferas, además de que la distribución de tamaños es mucho más amplia. Estas características podrían deberse a que las partículas adyacentes se aglutinan, producto de la hidratación de las partículas durante la preparación de la muestra para el análisis por microscopía. Esta hipótesis es sugerida porque la muestra que no contiene MAA cambió de aspecto al entrar en contacto con el medio ambiente, de tener una apariencia de polvo a formar un pequeño gel parcialmente hidratado; esto sucedió todas las veces que se realizó la preparación de la muestra previamente a su observación.

Durante la inspección realizada a las partículas de P(NIPAM) se encontró que, efectivamente, la hidratación propició la segregación de las partículas en la muestra. Las partículas que permanecen en zonas poco concentradas generan estructuras como como la observada en la parte superior de la Figura 3.12 (círculos rojos), mientras que las que se ubicaron en zonas altamente concentradas de partículas producen estructuras como las mostradas en la parte superior de la Figura 3.12 (recuadros amarillos). Deptula y colaboradores [31] sintetizaron nanopartículas P(NIPAM-co-BIS) y al realizar la caracterización morfológica mediante Crio-SEM, encontraron microestructuras tridimensionales interconectadas, por lo que argumentaron que "las soluciones que contienen estos materiales pueden organizarse para formar un andamio cuando son preparadas para ser observadas al microscopio" [31]. Si bien los autores no mencionan a qué se debe este efecto, sí permite reforzar la idea de que los microgeles a base de NIPAMco-BIS exhiben un comportamiento altamente higroscópico, ya que se ha reportado que el entrecruzante es más hidrofílico que el monómero [38].



Figura 3.12 Partículas P(NIPAM) entrecruzadas con BIS: micrografías FE-SEM de la emulsión liofilizada obtenidas en este trabajo (arriba), micrografías CrioSEM presentadas por Deptula [30] (abajo).

Una vez obtenidas las micrografías AFM y FE-SEM, se estimó el diámetro promedio aparente de las partículas, obtenido en cada técnica; estos valores fueron contrastados con las mediciones obtenidas por DLS de las partículas en la emulsión, tal y como se observa en la Figura 3.13.



Figura 3.13 Diámetro aparente medido por AFM, FE-SEM y DLS a las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%.

Es posible notar cómo las partículas de NIPAM entrecruzadas con BIS 6% sin MAA exhiben un comportamiento peculiar: las mediciones obtenidas a través de las imágenes arrojan que estas partículas tienen el tamaño más grande; sin embargo, los datos obtenidos mediante dispersión de luz indican que el tamaño de las partículas es menor a 20 nm. Por otra parte, a medida que se incrementa la cantidad de MAA, el tamaño de las partículas en los copolímeros tiende a disminuir, independientemente del método de medición.

Es importante considerar que factores como la preparación de las muestras (recubrimiento por evaporación, liofilización y dilución de la emulsión para AFM, FE-SEM y DLS, respectivamente) y la naturaleza misma de cada técnica de análisis, influyen sobre los resultados obtenidos. Así es posible identificar una diferencia en el tamaño de las partículas según el método utilizado, encontrándose que el menor error ocurrió en las mediciones realizadas en las micrografías de FE-SEM.

3.2.2.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros FTIR obtenidos para las partículas entrecruzadas con BIS 6% son presentados en la Figura 3.14. Además de las señales características del P(NIPAM), las cuales fueron descritas en un apartado previo, (Apartado 3.1.2.1) es fácil identificar la aparición de una banda en 1706 cm⁻¹ (línea punteada) cuando se incorpora el MAA; esta señal corresponde al estiramiento del enlace C=O del grupo carboxílico y su intensidad aumenta al incrementarse el contenido de MAA en la muestra. La presencia de este monómero se confirma con la pequeña banda ubicada en 2579 cm⁻¹, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos -OH (dímeros de COOH). Todo lo anterior también sugiere que las partículas observadas se encuentran colapsadas, por efecto del pH en la emulsión, previamente a la liofilización [48].



Figura 3.14 Espectro FTIR de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%.

3.2.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹H-RMN).

En la Figura 3.15 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protón correspondientes a las partículas entrecruzadas con BIS 6%. En el espectro de las partículas de P(NIPAM) entrecruzadas con BIS (sin MAA) se identifica en 1.0 ppm, la señal **e**, asignada a los protones de los metilos del grupo isopropilo, mientras que los protones de metinos y metilenos de la cadena hidrocarbonada aparecen en 1.2 y 1.42 ppm respectivamente (señales **b** y **a**). El pico **d**, ubicado en 3.79 ppm, está relacionado con el protón metino presente en el grupo isopropilo del NIPAM, mientras que la señal **c**, amplia y poco intensa que se encontró en 7.17 ppm es debida al protón que se encuentra unido a un nitrógeno, como ocurre en el NIPAM y el BIS [40, 41]. Las dos señales anteriormente señaladas disminuyen su intensidad con el incremento en la concentración de MAA.



Figura 3.15 Espectro 1H-RMN de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con 6% de BIS.

Aunque en los espectros de FTIR obtenidos para las partículas NIPAM/MAA (sección 3.2.2.2) se detectó la presencia de grupos carboxílicos, en los espectros de ¹H RMN de las mismas partículas no fue posible visualizar la señal correspondiente al protón del grupo carboxílico (típicamente observado a campo bajo en 12 ppm aproximadamente).

Lo anterior puede deberse a la desprotección del protón de los grupos carboxílicos debido a la formación de dímeros al disolverlo en DMSO-d₆, causando un desplazamiento hacia campo aún más bajo (Kesim y colaboradores han reportado el despliegue de la señal en 16.9 ppm [49]) o bien a la rapidez de intercambio de los protones con el disolvente.

3.2.2.4 Análisis termogravimétrico (TGA).

La Figura 3.16 presenta los termogramas de TGA y DTGA de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con 6% de BIS. Es posible observar que la estabilidad térmica de los copolímeros con MAA se ve disminuida con el incremento de la cantidad de MAA en el copolímero [50]. Adicionalmente, es posible identificar una pequeña caída (<10%) en todos los casos alrededor de 100 °C, la cual está relacionada con la pérdida de agua que adsorbieron los materiales después de ser liofilizados, debido a su naturaleza altamente hidrofílica.



Figura 3.16 Curvas termogravimétricas y primera derivada (DTGA) de las partículas P(NIPAM-co-MAA) entrecruzadas con 6% de BIS.

En general, se puede mencionar que es posible identificar 3 eventos térmicos en los copolímeros NIPAM-co-MAA: el primero, ubicado a 212 °C, corresponde a la eliminación de moléculas de agua como resultado de la formación de anhidros entre grupos COOH adyacentes del MAA; el segundo evento tiene lugar a 255 °C y se debe a la descomposición del anhídrido formado en la etapa anterior [51]; finalmente, la mayor pérdida de masa sucede alrededor de 400 °C y se debe a la escisión aleatoria en la cadena alifática restante.

En esta última etapa es posible identificar un desplazamiento de la temperatura de descomposición desde 393 °C, para el copolímero 1.0/1.0, hacia valores mayores conforme el contenido de MAA disminuye; es decir, las partículas de NIPAM entrecruzadas con BIS, sin MAA, exhiben una mayor estabilidad térmica (403 °C). Lo anterior, evidencia que la copolimerización del NIPAM con el monómero hidrofílico (MAA) disminuye la estabilidad térmica de los polímeros obtenidos [52].

Previamente se ha identificado, mediante el acoplamiento de técnicas termogravimétricas con espectroscópicas, que algunos de los productos generados durante la descomposición térmica de los copolímeros NIPAM-co-MAA son: agua, dióxido de carbono y oligómeros de la cadena principal, descartando la formación de monómeros de acrilamida, sugiriendo que no ocurre despolimerización como mecanismo de degradación térmica [42].

3.2.3 Caracterización de los hidrogeles: sensibilidad a estímulos.

3.2.3.1 Sensibilidad al pH y a la temperatura.

En la Tabla 3.6 se muestran los resultados obtenidos al realizar la medición del diámetro de las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% cuando son sujetas a cambios de pH y temperatura. Estos hidrogeles siguen una tendencia clara con respecto a su contenido de MAA: si se incrementa el contenido de ácido metacrílico, el tamaño de los hidrogeles disminuye gradualmente. Interesantemente, este comportamiento no depende del pH ni de la temperatura del medio. Es necesario destacar que el diámetro de las partículas obtenido mediante DLS corresponde al diámetro hidrodinámico de los hidrogeles a base de P(NIPAM-co-MAA) BIS 6% que se encuentran en su estado hidratado; por lo tanto, la diferencia entre este resultado y el obtenido mediante FE-SEM podría ser un indicador de la capacidad de absorción de agua bajo las diferentes condiciones de pH y temperatura.

En la Figura 3.17 se observa que la adición de MAA en los copolímeros mejora significativamente la absorción de agua en comparación con las partículas de P(NIPAM) sin MAA, entrecruzadas con BIS 6%, aunque esta conducta no presenta una tendencia clara en relación al contenido de ácido metacrílico en las partículas. Mientras tanto, resulta fácil observar cómo los nanogeles son capaces de absorber un mayor contenido de agua y mejorar considerablemente las propiedades de hinchamiento en función del pH en el medio.

	Tamaño (nm) a 25 °C				
NIPAM/ MAA		p	н		
-	4	5	6	7.4	
1.0/0.0	103 ± 4	169 ± 4	184 ± 5	187 ± 4	
1.0/0.3	165 ± 2	284 ± 2	240 ± 2	320 ± 14	
1.0/0.5	103 ± 3	150 ± 4	159 ± 6	168 ± 8	
1.0/0.8	81 ± 0	132 ± 3	143 ± 7	159 ± 4	
1.0/1.0	63 ± 1	100 ± 3	115 ± 4	138 ± 2	
		Tamaño (n	m) a 37 °C		
NIPAM/ MAA		р	н		
-	4	5	6	7.4	
1.0/0.0	95 ± 2	195 ± 4	186 ± 5	199 ± 6	
1.0/0.3	122 ± 2	290 ± 8	283 ± 14	315 ± 11	
1.0/0.5	104 ± 5	126 ± 4	171 ± 8	188 ± 7	
1.0/0.8	84 ± 8	158 ± 6	170 ± 10	161 ± 14	
1.0/1.0	**	100 ± 7	121 ± 6	141 ± 12	

Tabla 3.6 Efecto del pH y la temperatura del medio sobre el radio hidrodinámico de los hidrogeles P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% en PBS (1 mg/mL).

**: La muestra se agregó y precipitó, impidiendo la medición.



Figura 3.17 Hinchamiento de los nanogeles de P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% en función del pH a temperatura ambiente (izquierda) y similares a las fisiológicas (derecha).

Esto se puede explicar si se considera que la transición de volumen que experimentan estos nanogeles es debida a la ionización de los grupos carboxilos al disociarse este grupo funcional. Así mismo, se puede observar que los valores de hinchamiento determinados a 37 °C no muestran el cambio esperado de esta propiedad, al ser contrastados con las mediciones realizadas a 25 °C; esta aparente pérdida de la termosensibilidad podría estar relacionado con la incorporación del MAA como comonómero que aporte sensibilidad a cambios de pH [53, 54], la morfología de la partícula [23], la cantidad de BIS utilizado como agente entrecruzante [13], así como del medio utilizado (PBS en lugar de agua) [43].

- 3.2.4 Caracterización biológica.
- 3.2.4.1 Hemólisis.

La Figura 3.18 presenta los resultados de las pruebas de hemólisis realizadas a las partículas NIPAM-co-MAA entrecruzadas con BIS al 6%. Se puede observar que, aun cuando se observa un incremento de la hemoglobina liberada cuando se aumenta la cantidad de MAA incorporado en los copolímeros, todos los materiales evaluados demostraron no generar la ruptura en los eritrocitos en más del 5% (línea punteada), pudiendo categorizar estos materiales como hemocompatibles, según lo dictado por la norma ISO 10993-5.



Figura 3.18 Hemólisis causada por las partículas P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%, 1 mg/mL.

3.2.4.2 Cultivo de células endoteliales (BAOEC).

Como complemento a la caracterización biológica previa (hemólisis), se estudió la viabilidad celular de un linaje de células endoteliales de aorta bovina, como modelo *in vitro*, cuando las células entran en contacto directo con los nanogeles de P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). La viabilidad de las células BAOEC cultivadas se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico, el cual basa su funcionamiento en la reducción irreversible de resazurina a resofurina cuando las células mantienen un metabolismo activo, por lo que el medio de cultivo cambia de coloración azul a rosa. Por el contrario, las células no viables rápidamente pierden la actividad metabólica, por lo que no habrá reducción del indicador, manteniendo la tonalidad azul original, como se muestra a continuación en la Figura 3.19.



Figura 3.19 Viabilidad de las células endoteliales medida a través de la conversión de resazurina (azul) a resofurina (rosa) por efecto de la actividad metabólica.

Los resultados de proliferación de células BAOEC son presentados en la Figura 3.20, e indican que no existe una clara tendencia entre la cantidad de MAA y la viabilidad obtenida de los nanogeles P(NIPAM-co-MAA), tal y como se observó en el ensayo de hemólisis. A pesar de lo anterior, debe destacarse que ninguno los nanogeles indujeron muerte celular; de hecho, la viabilidad de las células endoteliales fue siempre mayor al 70%, incluso en las nanopartículas con mayor contenido de ácido metacrílico [55], por lo que se puede considerar que estos materiales no son citotóxicos, de acuerdo a lo reglamentado en la norma ISO 10993-5.



Figura 3.20 Viabilidad de las células BAOEC cultivadas en contacto directo con 1mg/mL de hidrogeles P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6%. La línea punteada representa el valor mínimo indicado en la norma ISO 10993-5.

Por último, la Figura 3.21 muestra la morfología de las células BAOEC cultivadas en contacto directo con los nanogeles P(NIPAM-co-MAA) entrecruzados con BIS al 6%. En general, las células endoteliales muestran una forma elongada, con el núcleo definido, así como proyecciones de la membrana celular, que además de servir como puntos de adhesión focal con el sustrato, están asociadas con una etapa de "activación" necesaria para la angiogénesis [56]. Adicionalmente, parece existir una tendencia de orientación favorecida por la incorporación de MAA, a diferencia de la morfología poligonal que esta línea celular exhibe al alcanzar un estado de confluencia.



Figura 3.21 Morfología de las células BAOEC cultivadas en contacto directo con nanogeles P(NIPAM-co-MAA)-BIS 6% durante 24, 48 y72 h (teñidas con cristal violeta y observadas a 20x).

CONCLUSIONES

- Se sintetizaron partículas de P(NIPAM-co-MAA) con diferentes concentraciones de MAA, mediante la técnica de polimerización en emulsión con rendimientos de reacción mayores al 90%. El polímero fue obtenido en forma de partículas de escala nanométrica, con morfología predominantemente esférica (AFM y FE-SEM), y cuyo diámetro se redujo al aumentar el contenido de MAA. La incorporación de MAA en los copolímeros se corroboró mediante FTIR y ¹H-RMN, además de exhibir menor estabilidad térmica en comparación con los homopolímeros.
- 2. Las nanopartículas de P(NIPAM-co-MAA) forman geles al ser dispersadas en medio acuoso, además de exhibir transiciones de volumen significativas cuando el pH de la solución cambia, principalmente hacia valores inferiores a 5. El efecto de la temperatura no fue identificado, pues existe un aparente incremento en el tamaño de las partículas cuando se miden en buffer salino asociado con el cambio de la LCST de los copolímeros.
- 3. La incorporación de MAA a los copolímeros que generan nanogeles, incrementó el porcentaje de hemólisis; a pesar de esto, todos los materiales resultaron ser hemocompatibles (1 mg/mL). Los resultados de proliferación de células endoteliales (BAOEC) indican que los nanogeles de P(NIPAM-co-MAA) no inducen la muerte de las mismas, sino que, por el contrario, la viabilidad se ve favorecida hasta por 72 h.
- 4. Las nanopartículas a base de P(NIPAM-co-MAA) forman nanogeles capaces de modificar su tamaño en respuesta a variaciones de pH, además de ser hemocompatibles y no mostrar citotoxicidad, por lo que puede ser un material versátil para la liberación controlada y específica de fármacos, ya sea por administración oral o parenteral.
RECOMENDACIONES

Entre las recomendaciones que se sugieren para trabajos futuros se tienen las siguientes:

- Cuantificar los grupos ácidos carboxílicos incorporados en los copolímeros.
- Caracterizar la morfología de las nanopartículas en función de la concentración de agente entrecruzante.
- Caracterizar la temperatura a la cual ocurre la transición de volumen en los hidrogeles.
- Evaluar otros parámetros de hemocompatibilidad (activación del complemento, agregación plaquetaria y/o activación de linfocitos).
- Determinar la eficiencia de encapsulamiento y liberación de moléculas de interés farmacológico *in vitro*.
- Estudiar el efecto de la composición del polímero en la interacción con sangre.

REFERENCIAS

- A. Badar, S. Pachera y A. L. N. Ansari, «Nano based drug delivery systems: present and future prospects,» *Nanomedicine and Nanotechnology Journal*, vol. 2, nº 1, pp. 1-9, 2019.
- [2] E. Castro y A. Kumar, «Nanoparticles in drug delivery systems,» de *Nanomedicine in Drug Delivery*, Boca Ratón, CRC Press Taylor & Francis Group, 2013, pp. 1-22.
- [3] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny y F. Delie, «Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 69, nº 1, pp. 1-9, 2008.
- [4] K. Park, W. Shalaby y H. Park, Biodegradable hydrogels for drug delivery, USA: Technomich Publishing Co. INC., 1993.
- [5] D. Moreau, C. Chauvet, F. Etienne, F. Rannou y L. Corté, «Hydrogel films and coatings by swelling-induced gelation,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, nº 47, pp. 13295-13300, 2016.
- [6] E. Caló y V. Khutoryanskiy, «Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products,» *European Polymer Journal*, vol. 65, pp. 252-267, 2015.
- [7] K. Zhang, Wu y X, «Temperature and pH-responsive polymeric composite membranes for controlled delivery ofproteins and peptides,» *Biomaterials*, vol. 25, pp. 5281-5291, 2003.
- [8] X. Gao, Y. Cao, X. Song, Z. Zhang, C. Xiao, C. He y X. Chen, «pH- and thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative) copolymers with LCST dependent on pH and alkyl side groups,» *Journal of Materials Chemistry B*, n^o 1, pp. 5578-5587, 2013.
- [9] P. Bernfield y J. Wan, «Antigens and enzimes made insoluble by entrapping then into lattices of synthetic polymers,» *Science*, nº 142, p. 678, 1963.
- [10] C. Gordijo, A. Shuhendler y Y. Wu, «Glucose-responsive bioinorganic nanohydrid membrane for self-regulated insuline release.,» Advanced Functional Materials, vol. 20, pp. 1404-1412, 2010.
- [11] Z. Gu, A. Aimetti, Q. Wang, T. Dang y T. Zhang, «Injectable nano-network for glucosemediated insulin delivery.,» ACS Nano, vol. 7, pp. 4194-4201., 2013.
- [12] D. Schmaljohann, «Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery,» Advanced drug delivery reviews, vol. 58, pp. 1655-1670, 2006.

- [13] P. Tian, Q. Wu y K. Lian, «Preparation of temperature- and pH-sensitive, stimuli responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) nanoparticles,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 108, pp. 2226-2232, 2008.
- [14] O. Okay, «General properties of hydrogels,» de *Hydrogels Sensors and Actuators*, Springer, 2010, pp. 1-14.
- [15] Futscher, M, M. Philipp y A. Schulte, «The role of backbone hydration of poly(Nisopropyl acrylamide) across the volume phase transition compared to its monomer,» *Scientific Reports*, vol. 17012, nº 7, pp. 1-10, 2017.
- [16] T. Sliwa y M. Jarzebski, «Dynamic light scattering investigation of PNIPAM-co-MAA microgel solution,» *Current Topics of Biophysics*, nº 37, pp. 29-33, 2014.
- [17] S. Lanzalaco y E. Armelin, «Poly(N-isopropylacrylamide) and copolymers: A review on recent progresses in biomedical applications,» *Gels,* vol. 3, nº 36, pp. 1-31, 2017.
- [18] M. Heskins y J. Guillet, «Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide),» Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry, vol. A2, nº 8, pp. 1441-1455, 1968.
- [19] P. Honey, J. Rijo, A. Anju y K. Anoop, «Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview,» Acta Pharmaceutica Sinica B, pp. 1-8, 2014.
- [20] A. Kumara, A. Srivastavaa, I. Galaev y B. Mattiasson, «Smart Polymers: Physical forms and bioengineering applications,» *Progress in polymer science*, vol. 32, pp. 205-1237, 2007.
- [21] X. Hu, W. Wei, X. Qi, H. Yu, J. Feng, J. Li y W. Dong, «Preparation and characterization of a novel pH sensitive salecan-g-poly(acrylic acid) hydrogel for controlled release of doxorubicin,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, nº 13, pp. 2685-2697, 2015.
- [22] S. Chen, X. Jiang y L. Sun, «Reaction mechanisms of N-isopropylacrylamide soapfree emulsion polymerization based on two different initiators,» *Journal of macromolecular science, part A: Pure and applied Chemistry*, vol. 51, pp. 477-455, 2014.
- [23] T. Hoare y R. Pelton, «Impact of microgel morphology on functionalized microgel-drug interactions,» *Langmuir,* vol. 24, pp. 1005-1012, 2008.
- [24] J. Wei, Y. Li y T. Ngai, «Tailor-made microgel particles: Synthesis and characterization,» Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects, vol. 489, pp. 122-127, 2016.
- [25] J. De-Abajo y D. Gallardo, «Técnicas de polimerización,» de Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos, Madrid, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, 2004, pp. 125-143.

- [26] B. Khan, N. Akhtar, H. Khan, K. Waseem, T. Mahmood, A. Rasul, M. Iqbal y H. Khan, «Basics of pharmaceutical emulsions: A review,» *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 25, pp. 2715-2725, 2011.
- [27] F. Goodarzi y S. Zendehboudi, «A comprehensive review on emulsions and emulsion stabilization chemical and energy industries,» *The Canadian Journal of Chemicar Engineering*, vol. 97, pp. 281-309, 2019.
- [28] A. El-hoshoudy, «Emulsion polymerization mechanism,» de *Recent Research in Polymerization*, Nevin Cankaya, IntechOpen, 2017, pp. 3-14.
- [29] Q. Wu y P. Tian, «Adsorption of Cu2+ ions with poly(N-isopropylacrylamide-comethacrylic acid) micro/nanoparticles,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 109, pp. 3470-3476, 2008.
- [30] K. Zhang y X. Wu, «Modulated insulin permeation across a glucose-sensitive polymeric composite membrane,» *Journal of Controlled Release*, vol. 80, pp. 169-178, 2002.
- [31] T. Deptula, A. Warowicka, A. Wozniak, M. Grzeszkowiak, M. Jarzębski, Bednarowicz, M, A. Patkowski, Słomski y R, «Cytotoxicity of thermo-responsive polymeric nanoparticles based on N-isopropylacrylamide for potential application as a bioscaffold,» Acta Biochimica Polonica, vol. 62, nº 2, pp. 311-316, 2015.
- [32] X. Wu y P. Lee, «Preparation and characterization of thermal and pH sensitive nanospheres,» *Pharmaceutical Research*, vol. 10, nº 10, pp. 1544-1547, 1993.
- [33] S. Rasib, H. Akil y A. Yahya, «Effect of different composition on particle size chitosan-PMAA-PNIPAM hydrogel,» *Procedia Chemestry*, vol. 19, pp. 388-393, 2016.
- [34] V. Torchillin, V. Tischenko, N. Smirnov y E. Chazov, «Immobilization of enzymes on slowly soluble ccarriers,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 11, pp. 233--235, 1977.
- [35] S. Shi, Q. Wang, T. Wang, S. Ren, Y. Gao y N. Wang, «Thermo-, pH-, and lightresponsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic)–Au hybrid microgels prepared by the in Situ Reduction Method Based on Au-thiol chemistry.,» *The Journal of Physical Chemestry B*, vol. 118, pp. 7177-7186, 2014.
- [36] T. Hoare y D. McLean, «Kinetic prediction of functional group distributions in thermosensitive microgels,» *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, nº 41, pp. 20327-20336, 2006.
- [37] M. Kwok, Z. Li y T. Ngai, «Controlling the synthesis and chracterization of micrometersized PNIPAM microgels with tailored morphologies,» *Langmuir*, vol. 29, pp. 9581-9591, 2013.
- [38] X. Zhu, X. Gu, L. Zhang y X. Kong, «Preparation and characterization of nanosized P(NIPAM-MBA) hydrogel particles and adsorption of bovine serum albumin on their surface.,» Nanoscale Research Letters, vol. 8, nº 519, pp. 1-8, 2012.

- [39] F. Meunier, C. Pichot y A. Elaissari, «Effect of thiol-containing monomer on the preparation of temperature-sensitive hydrogel microspheres,» *Colloid and Polymer Science*, vol. 284, nº 11, pp. 1287-1292, 2006.
- [40] S. Jadhav, V. Brunella, I. Miletto, Berlier, G y D. Scalarone, «Synthesis of poly(Nisopropylacrylamide) by distillation precipitation polymerization and quantitative grafting on mesoporous silica,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 133, pp. 44181-44189, 2016.
- [41] S. Rwei, H. Anh, W. Chiang y T. Way, «Synthesis and characterization of pH and thermo dual-responsive hydrogels with a semi-IPN structure based on Nisopropylacrylamide and itaconamic acid,» *Materials*, vol. 11, nº 696, pp. 1-21, 2018.
- [42] H. Schild, «Thermal decomposition of PNIPAAM: TGA-FTIR analysis,» *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemestry,* vol. 44, pp. 2259-2262, 1996.
- [43] J. Huang y X. Wu, «Effects of pH, salt, surfactant and composition on phase transition of poly(NIPAm/MAA) nanoparticles,» *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, vol. 37, pp. 2667-2676, 1999.
- [44] J. Szebeni y P. Haima, «Hemocompatibility of medical devices, blood products, nanomedicines and biologicals,» TECOMedical, Suiza, 2013.
- [45] Y. Zhang, J. Cai, C. Li, J. Wei, Z. Liu y W. Xue, "Effects of thermosensitive poly(Nisopropylacrylamide) on blood coagulation," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, n^o 21, pp. 3733-3749, 2006.
- [46] S. Dhanya, D. Bahadur, G. Kundu y R. Srivastava, «Maleic acid incorporated poly-(Nisopropylacrylamide) polymer nanogels for dual-responsive delivery of doxorubicin hydrochloride.,» *European Polymer Journal*, vol. 49, pp. 22-32, 2013.
- [47] D. Huo, Y. Li, Q. Qian y K. T, «Temperature–pH sensitivity of bovine serum albumin protein-microgels based on cross-linked poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid),» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 50, pp. 36-42, 2006.
- [48] J. Zhang y N. Peppas, «Molecular interactions in poly(methacrylic acid)/poly(Nisopropyl acrylamide) interpenetrating polymer networks,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 82, pp. 1077-1082, 2001.
- [49] H. Kesim, Z. Rzaev y P. E. Dincer, «Functional bioengineering copolymers II. Synthesis and characterization of amphiphilic poly(N-isopropyl acrylamide-co-maleic anhydride) and its macrobranched derivatives,» *Polymer*, vol. 44, pp. 2897-2909, 2003.
- [50] E. Díez-Peña, I. Quijada-Garrido y J. Barrales-Rienda, «Hydrogels based on Nisopropylacrylamide and methacrylic acid: thermal stability and glass transition behaviour,» *Polymer Bulletin*, vol. 48, pp. 83-89, 2002.

- [51] H. G. Schild, «Thermal degradation of Poly(methacrylic acid): further studies applying TGA/FTIR,» *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemestry*, vol. 31, pp. 2403-2405, 1993.
- [52] E. Díez-Peña, I. Quijada-Garrido y J. Barrales-Rienda, «Hydrogels based on Nisopropylacrylamide and methacrylic acid: thermal stability and glass transition behaviour,» *Polymer Bulletin*, vol. 48, pp. 83-91, 2002.
- [53] G. Fundueanu, M. Constantin, S. Bucatariu y P. Ascenzi, «pH/thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-maleic acid) hydrogel with a sensor and an actuator for biomedical applications,» *Polymer*, vol. 110, pp. 177-186, 2017.
- [54] M. Constantin, S. Bucatariu, V. Harabagiu, I. Popescu, P. Ascenzi y G. Fundueanu, «Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) pH/thermo-responsive porous hydrogels as self-regulated drug delivery system,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, nº 1, pp. 86-95, 2014.
- [55] M. Cooperstein y H. Canavan, «Assessment of cytotoxicity of (N-isopropylacrylamide) and Poly(N-isopropyl acrylamide) coated surfaces,» *Biointerphases*, vol. 8, nº 19, pp. 1-12, 2013.
- [56] H. Kim, K. Yang, H. Cho, G. Gwak, S. Park, J. Kim, S. Yum y I. Moon, "Different effects of obital shear stress on vascular endothelial cells: Comparison with the results of in vivo study with rats," *Vascular Specialist International*, vol. 31, pp. 33-40, 2015.