



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

“Síntesis y caracterización de dendrímeros de poliamidoamina y liberación de 5-fluorouracil a partir de sus complejos y de sus recubrimientos”

Tesis que presenta

JUAN JOSÉ ENCALADA ALAYOLA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS EN MATERIALES  
POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán, México

2023

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y 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 Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al 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 registrarán 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.

Firma: Juan Encalada

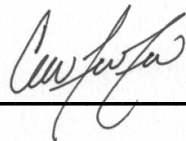
Juan José Encalada Alayola



## **RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Juan José Encalada Alayola** titulado “**Síntesis y caracterización de dendrímeros de poliamidoamina y liberación de 5-fluorouracil a partir de sus complejos y de sus recubrimientos**” fue realizado en la Unidad de Materiales, línea de investigación en Materiales para Medicina Regenerativa en el laboratorio de Biomateriales, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. José Manuel Cervantes Uc y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

**Atentamente**



---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 30 de marzo de 2023.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por permitirme utilizar sus instalaciones y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de esta investigación (Número de becario 700324).

A los laboratorios de Química macromolecular y de Biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., al laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN - Unidad Mérida, y al laboratorio de Microscopía de la Universidad Anáhuac Mayab.

A mi director de tesis el Dr. José Manuel Cervantes Uc por su excelente asesoramiento y consejos que me permitieron elaborar esta investigación.

A mis tutores de tesis, el Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis y el Dr. José Herminsul Mina Hernández por sus revisiones y aportaciones a la tesis.

A mis revisores de tesis, el Dr. Jorge Alonso Uribe Calderón y el Dr. Gerardo Manuel Alonzo Medina por sus observaciones, apoyo, revisiones y aportaciones a la tesis.

A los técnicos, el Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao, el Lic. Santiago Duarte Aranda y la Lic. Rossana Faride Vargas Coronado por la caracterización espectroscópica y térmica de mis materiales, a la Dra. Gloria Ivonne Hernández Bolio por los análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Protón, así como al Dr. Gerardo Manuel Alonzo Medina y al Dr. Rubén Domínguez Maldonado por los análisis de energía dispersiva de rayos X.

A mis padres, Juan José Encalada González y Nidia del Socorro Alayola Rivero por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos de la unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán por su apoyo brindado durante este proyecto.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Estado del arte .....	3
1.1.1. Síntesis de dendrímeros .....	3
1.1.2. Complejos de dendrímero/fármaco.....	4
1.1.3. Polímeros de polisacáridos para la administración de fármacos dirigida al colon .....	5
1.2. Cronología de los sistemas de administración de fármacos.....	7
1.3. Sistemas de liberación de fármacos .....	9
1.4. Tipos de nanoacarreadores en la administración de fármacos .....	10
1.5. Dendrímeros .....	10
1.6. Nanopartículas en terapias contra el cáncer .....	14
1.7. 5-fluorouracilo (5-FU) .....	15
1.8. Fisiología del tracto gastrointestinal y estrategias para administrar medicamentos en el colon.....	16
1.9. Polisacáridos.....	17
1.10. Enzimas .....	18
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVOS .....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos .....	21
CAPÍTULO 2 .....	22
2.1. Materiales .....	22
2.2. Síntesis de dendrímeros de PAMAM .....	22
2.2.1 Procedimiento general .....	22
2.2.2 Síntesis de dendrímeros de media generación (-0.5G, 0.5G y 1.5G) .....	23
2.2.3 Síntesis de dendrímeros de generación completa (0.0G, 1.0G y 2.0G).....	23
2.3. Caracterización de los dendrímeros de PAMAM.....	25
2.3.1 Pruebas de color y de solubilidad.....	25

2.3.2	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	25
2.3.3	Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis).....	25
2.3.4	Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-1H).....	26
2.3.5	Dispersión de luz dinámica (DLS) .....	26
2.3.6	Análisis termogravimétrico (TGA).....	26
2.4.	Caracterización del 5-FU .....	26
2.5.	Caracterización de los complejos de dendrímero/fármaco (PAMAM/5-FU) .....	27
2.5.1	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	27
2.5.2	Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis).....	28
2.5.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	28
2.5.4	Microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDX) y mapeo de elementos .....	28
2.5.5	Microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión (SEM-TEM).....	28
2.6.	Estudios de liberación del 5-FU a partir de los complejos PAMAM/5-FU .....	29
2.6.1.	Determinación del fármaco encapsulado .....	29
2.6.2.	Liberación <i>in vitro</i> .....	30
2.6.3.	Modelado de la liberación.....	31
2.7.	Recubrimiento de los complejos de PAMAM/5-FU con GG .....	32
2.7.1.	Elaboración de pastillas .....	32
2.7.2.	Estudios de liberación <i>in vitro</i> .....	33
2.7.3.	Activación de la enzima.....	34
2.7.4.	Determinación de la cantidad de 5-FU liberado.....	35
CAPÍTULO 3 .....		36
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
3.1.	Caracterización de los dendrímeros de PAMAM.....	36
3.1.1.	Propiedades generales.....	36
3.1.2.	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.....	37
3.1.3.	Espectroscopia de ultravioleta visible.....	38
3.1.4.	Resonancia magnética nuclear de protón.....	40
3.1.5.	Dispersión de luz dinámica .....	41
3.1.6.	Análisis termogravimétrico .....	42
3.2.	Caracterización del 5-FU .....	43
3.3.	Caracterización de los complejos de PAMAM/5-FU .....	45
3.3.1.	Propiedades .....	45

3.3.2.	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier .....	45
3.3.3.	Espectroscopia de ultravioleta visible.....	47
3.3.4.	Análisis termogravimétrico .....	48
3.3.5.	Microscopía Electrónica de Barrido .....	49
3.3.6.	Microanálisis por dispersión de energía de rayos X.....	51
3.4.	Estudios de liberación .....	52
3.4.1.	Eficiencia de encapsulación .....	52
3.4.2.	Liberación <i>in vitro</i> del 5-FU de los dendrímeros de generación completa....	53
3.4.3.	Liberación <i>in vitro</i> del 5-FU de los dendrímeros de media generación.....	54
3.4.4.	Comparación entre complejos de dendrímeros de media generación y generación completa.....	55
3.4.5.	Modelado de la cinética de liberación de 5-FU.....	56
3.5.	Estudios de liberación <i>in vitro</i> a partir de las tabletas recubiertas con goma guar	57
3.5.1.	Efecto del pH y tiempo sobre los recubrimientos de GG .....	57
3.5.2.	Efecto de la actividad enzimática sobre los recubrimientos de GG .....	58
3.5.3.	Efecto del tiempo, pH y de la actividad enzimática sobre los complejos de dendrímero/fármaco, recubiertos con GG .....	59
CONCLUSIONES .....		61
ANEXOS.....		62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Cantidades utilizadas en la síntesis de dendrímeros de PAMAM.....	24
Tabla 3.1 Diámetros de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G). .....	41
Tabla 3.2 Composición elemental de EDX de los complejos de PAMAM/5-FU.....	52
Tabla 3.3 Eficiencia de encapsulación de los complejos de PAMAM/5-FU.....	53
Tabla 3.4 Resultados de los modelos matemáticos utilizados para describir las curvas de liberación de 5-FU. ....	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos (a) inorgánicos y (b) orgánicos. ....	10
Figura 1.2 Componentes de un dendrímero de PAMAM. ....	11
Figura 1.3 Método de crecimiento divergente y convergente de dendrímeros. ....	13
Figura 1.4 Complejo y conjugado de dendrímero/fármaco.....	14
Figura 1.5 Estructura química del 5-fluorouracilo.....	16
Figura 1.6 Esquema del tracto gastrointestinal.....	17
Figura 1.7 Estructura química de la goma guar.....	18
Figura 1.8 Esquema de la degradación enzimática de la GG.....	19
Figura 2.1 Mecanismo de la síntesis de dendrímeros de PAMAM: (a) reacción de Michael y (b) reacción de amidación. ....	23
Figura 2.2 Esquema del proceso síntesis de dendrímeros de PAMAM.....	24
Figura 2.3 Mecanismo de la formación de complejos de PAMAM/5-FU.....	27
Figura 2.4 Espectro UV-vis del 5-FU.....	30
Figura 2.5 Curva de calibración del 5-FU a $\lambda = 264$ nm.....	30
Figura 2.6 Esquema del proceso de diálisis. ....	31
Figura 2.7 Esquema del proceso de recubrimiento.....	33
Figura 2.8 Esquema de la liberación in vitro del 5-FU a partir de las tabletas recubiertas con GG.....	34
Figura 3.1. Prueba colorimétrica de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G). ....	37
Figura 3.2. Espectros de FTIR de los monómeros (EDA y MA) y de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G). ....	38
Figura 3.3. Espectros de UV-vis de los monómeros (EDA y MA) y de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G). ....	39
Figura 3.4. Espectros RMN-1H de los monómeros (EDA y MA) y de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G). ....	40
Figura 3.5. Curvas de (a) TGA y (b) DTGA de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G). ....	43
Figura 3.6 (a) espectro de FTIR, (b) espectro de UV-vis, (c) curvas TGA/DTGA y (d) micrografía SEM del 5-FU.....	44
Figura 3.7. Espectros FTIR de los dendrímeros de PAMAM y de los complejos de PAMAM/5-FU.....	46
Figura 3.8. Representación esquemática de los puentes de hidrógeno entre los dendrímeros (generación media y completa) y el 5-FU.....	47
Figura 3.9. Espectros UV-vis de los dendrímeros de PAMAM y de los complejos de PAMAM/5-FU.....	48
Figura 3.10. Curvas de TGA de los dendrímeros de PAMAM y los complejos de PAMAM/5-FU.....	49
Figura 3.11. Microscopias de SEM de los complejos de PAMAM/5-FU. ....	50
Figura 3.12. Microscopia de TEM del complejo PAMAM/5-FU (0.0G/5-FU). ....	51
Figura 3.13. Mapeo EDS del complejo PAMAM/5-FU (0.0G/5-FU). ....	52
Figura 3.14. Perfiles de liberación in vitro del 5-FU de los complejos de PAMAM/5-FU. ....	54

Figura 3.15. Perfiles de liberación in vitro del 5-FU de los complejos de PAMAM/5-5FU. .....	55
Figura 3.16. Perfiles de liberación in vitro del 5-FU de los complejos de PAMAM/5-5FU. .....	56
Figura 3.17. Liberación del 5-FU a partir de los recubrimientos de GG en medios que simulan el PH del estómago, intestino y colon.....	58
Figura 3.18. Liberación del 5-FU a partir de los recubrimientos de GG en medios que simulan el estómago, intestino y colon humano (enzima de mananasa). ....	59
Figura 3.19. Liberación del 5-FU de los complejos de PAMAM/5-5FU recubiertos con GG en medios que simulan el estómago, intestino y colon humano (enzima de mananasa). ....	60

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue investigar el potencial de un nuevo sistema polimérico para la administración de fármacos controlada y focalizada, utilizando formulaciones basadas en dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) y en goma guar (GG). Para ello, se sintetizaron y caracterizaron diversos dendrímeros de PAMAM (desde la generación -0.5 hasta la generación 2.0) mediante técnicas espectroscópicas y análisis térmico. Luego, el 5-fluorouracilo (5-FU) se incorporó con éxito a los dendrímeros, y los complejos resultantes se caracterizaron mediante microscopia, composición elemental, espectroscopia y análisis térmico. También, se realizaron estudios de liberación *in vitro* del 5-fluorouracilo a partir de los complejos; y se modeló la cinética de liberación. Además, los complejos se recubrieron con GG y se evaluó la resistencia del recubrimiento en diferentes medios que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal. La síntesis exitosa de los dendrímeros de PAMAM fue confirmada por análisis de FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, UV-vis, DLS y TGA. Los resultados de EDX, FTIR, UV-vis y TGA confirmaron la complejación entre los dendrímeros y el fármaco. Se encontró que la eficiencia de encapsulación y la tasa de liberación del fármaco están en función del tipo de generación, y que los dendrímeros de generación completa mostraron los mejores resultados. El modelo de Korsmeyer-Peppas describió mejor la cinética de liberación del fármaco para todos los complejos. Los estudios de liberación *in vitro* de los complejos recubiertos con goma guar, demostraron que la GG es capaz de resistir las condiciones simuladas de pH, temperatura, y el tiempo de tránsito (desde la ingesta hasta el colon); también, se observó que es susceptible a degradarse por la enzima mananasa. Estos resultados confirman que el sistema propuesto a base de dendrímeros de PAMAM y GG, es adecuado para la administración controlada y focalizada del 5-FU en medios fisiológicos similares al del colon.

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the potential of a new polymeric system for controlled and targeted drug delivery, using formulations based on polyamidoamine dendrimers (PAMAM) and guar gum (GG). For this, PAMAM dendrimers (up to 2.0 generation) were synthesized and characterized by means of spectroscopic techniques and thermal analysis. Then, 5-FU was successfully incorporated into dendrimers, and the resulting complexes were characterized in terms of their microscopy, elemental composition, spectroscopic techniques and thermal analysis. *In vitro* release studies of 5-fluorouracil from complexes were also conducted using phosphate-buffered saline; and the 5-FU release kinetics was modeled. In addition, the complexes were coated with GG and their resistance in simulated gastrointestinal fluids was evaluated. The successful synthesis of PAMAM dendrimers was confirmed by FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, UV-vis, DLS and TGA analysis. EDX, FTIR, UV-vis and TGA results confirmed the complexation phenomena among PAMAM dendrimers and 5-FU drug. It was found that the encapsulation efficiency and drug release rate are a function of generation type, being the full-generation dendrimers, which showed the best results. The Korsmeyer-Peppas model best described the kinetics of drug release for all complexes. In the drug release studies, the GG-coated complexes were able of withstanding the simulated conditions of pH, temperature, mouth-to-colon transit time and being degraded by the mannanase enzyme. These results confirm that the proposed system based on PAMAM dendrimers and GG is suitable for the controlled and targeted administration of 5-FU in in simulated colonic fluids.

## INTRODUCCIÓN

Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas hiperramificadas de tamaño nanométrico y de forma globular. Su estructura se compone de tres partes: (i) un núcleo, (ii) unidades repetitivas (llamadas generaciones, G) unidas covalentemente al núcleo, y (iii) una superficie multifuncional con un alto número de potenciales sitios reactivos. De todas las familias dendríticas, los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) son probablemente los más estudiados desde su descubrimiento a finales de la década de 1970 [1–5].

Los dendrímeros de PAMAM se han utilizado en varias aplicaciones biomédicas, como biosensores electroquímicos, agentes de contraste y en terapia génica para la administración de genes. También se han utilizados como nanoacarreadores para la administración de fármacos debido a su síntesis relativamente simple, y a su capacidad de conjugación y complejación con otras moléculas (por ejemplo: péptidos, proteínas y/o fármacos). De hecho, se han utilizado una amplia variedad de fármacos para formar complejos con los dendrímeros de PAMAM, como ketoprofeno, diflunisal, doxorubicina, ibuprofeno e indometacina; también se ha incorporado 5-fluorouracilo, un fármaco utilizado para tratar distintos tipos de cáncer [6–12]. Sin embargo, el uso extensivo del 5-FU produce efectos secundarios indeseables (por ejemplo: fiebre, náuseas, ulceración epitelial, etc.), por tal motivo, para maximizar su eficacia y reducir sus efectos secundarios, el 5-FU debe incorporarse en vectores apropiados, como los dendrímeros de PAMAM, para proporcionar una liberación adecuada del fármaco [13].

Por otra parte, a pesar de las amplias aplicaciones biomédicas de los dendrímeros, su uso en sistemas biológicos sigue siendo limitado debido a la potencial toxicidad asociada a ellos. Jain *et al.* [14] y Janaszewska *et al.* [15] reportaron que la citotoxicidad de los dendrímeros depende en gran medida del número y la naturaleza de los grupos funcionales presentes en la capa externa. De esta forma, los dendrímeros catiónicos (grupos terminales de amina) presentan una alta toxicidad, en comparación con los dendrímeros aniónicos (grupos terminales metoxi) que presentan efectos tóxicos leves o nulos. Por lo tanto, es posible postular que los dendrímeros de PAMAM con pocos grupos terminales de amina (por ejemplo: 0.0, 1.0 y 2.0G) y con grupos aniónicos (por ejemplo: 0.5 y 1.5G) son menos citotóxicos en comparación con otros dendrímeros, y que se pueden utilizar como nanoacarreadores para el fármaco 5-FU.

Otro inconveniente con el uso nanoacarreadores de fármacos, como los dendrímeros, se debe a que después de su administración (por ejemplo: por vía oral, parental, etc.) se distribuyen de forma aleatoria en el organismo. Por lo tanto, para tener una mejor eficacia, el sistema de liberación debe ser capaz de liberar el medicamento cerca de su objetivo. Para lograr esto, los dendrímeros pueden ser recubiertos con polisacáridos, como los galactomananos, para protegerlos contra el entorno biológico y fisiológico (es decir: temperatura, pH, enzimas, etc.) que tiene que atravesar hasta llegar al lugar deseado, evitando que se distribuyan en todo el organismo. Entre estos polisacáridos se encuentra la goma guar, la cual se ha observado que permanece intacta en el ambiente fisiológico del estómago y el intestino delgado, pero es susceptible a la degradación enzimática en el colon humano [13,16–18].

Considerando lo anterior, se sintetizaron y caracterizaron dendrímeros de PAMAM catiónicos y aniónicos de baja generación (es decir: 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G) y se evaluó su uso como nanoacarreadores para el 5-fluorouracilo. Posteriormente, los complejos de dendrímero/fármaco se recubrieron con goma guar y se sometieron a estudios de liberación *in vitro* en medios fisiológicos que simulaban el tracto gastrointestinal, con el fin de evaluar la capacidad de protección y de degradación del material de recubrimiento.

## CAPÍTULO 1

### 1. ANTECEDENTES

#### 1.1. Estado del arte

##### 1.1.1. Síntesis de dendrímeros

El primer trabajo sobre moléculas que se consideran precursoras de los dendrímeros apareció en 1978. Vögtle *et al.* [19] sintetizaron moléculas ramificadas mediante reacciones de tipo Michael de un acrilonitrilo a una amina primaria, seguidas de la reducción de los grupos de nitrilo para producir nuevas aminas. La repetición de estas dos reacciones dio como resultado moléculas ramificadas de bajo peso molecular. Años más tarde, Tomalia *et al.* [20] reportaron la síntesis y caracterización de la primera familia dendrítica, ahora conocida como dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). En la década de 1980 se produjeron otros desarrollos en la síntesis de macromoléculas dendríticas; sin embargo, el trabajo de Tomalia *et al.* provocó el inicio de investigaciones sobre dendrímeros de PAMAM que han continuado hasta el presente [19].

Convencionalmente, los dendrímeros de PAMAM se sintetizan mediante el método de crecimiento divergente desarrollado por Tomalia *et al.* En este método, la síntesis se realiza a partir de un núcleo de etilendiamina, y el crecimiento del dendrímero se logra alternando entre dos reacciones, una alquilación con acrilato de metilo y una amidación con etilendiamina [20]. Los cambios más significativos que ha experimentado la síntesis de dendrímeros de PAMAM consisten en utilizar un núcleo diferente a la etilendiamina o un acrilato distinto al acrilato de metilo. Por ejemplo, Ozturk *et al.* [21] utilizó un núcleo de amoníaco, mientras que Sabahi *et al.* [22] utilizó acrilatos de etilo, butilo y hexilo para el crecimiento de los dendrímeros. En otro trabajo, reportado por Majoros *et al.* se sintetizó un dendrímero híbrido de polipropileimina y poliamidoamina [23]. Por otra parte, existe una variedad de macromoléculas dendríticas que también se han sintetizado como: polipropilenimina, polieterhidroxilamina, poliesteramina, poli-L-lisina, o dendrímeros de poliglicerol [15].

### 1.1.2. Complejos de dendrímero/fármaco

Debido a las propiedades únicas (por ejemplo: rango de tamaño nanométrico, baja polidispersidad y facilidad para albergar distintas moléculas y de los dendrímeros de PAMAM, estas macromoléculas son plataformas ideales para albergar y administrar fármacos. Por ejemplo, Yiyun *et al.* [11] evaluaron la capacidad de los dendrímeros de PAMAM de generación 5 para la administración transdérmica de fármacos antiinflamatorios utilizando ketoprofeno y diflunisal. Los estudios de permeación *in vitro* (utilizando pieles de rata) revelaron que los dendrímeros de PAMAM aumentaron la cantidad permeada de ambos fármacos después de 24 h, en comparación con las formulaciones de fármacos sin dendrímeros. Además, los estudios para medir los niveles de fármaco en la sangre revelaron que la biodisponibilidad era 2.73 veces mayor para el complejo de PAMAM/ketoprofeno y 2.48 veces mayor para el complejo de PAMAM-diflunisal, en comparación con las formulaciones de fármacos puros.

Ke *et al.* [9] desarrollaron un complejo a base de dendrímeros de PAMAM 3.0G y doxorrubicina, y estudiaron la captación celular del complejo. Informaron que la captación celular de doxorrubicina en células Caco-2 tratadas con el complejo aumentó significativamente en comparación con las tratadas solo con doxorrubicina.

Kolhe *et al.* [8] encapsularon moléculas de ibuprofeno en dendrímeros de poliamidoamina de generación 3 y estudiaron la interacción entre el fármaco y los dendrímeros. Los resultados FTIR sugieren que el ibuprofeno forma complejos con los dendrímeros de PAMAM debido a la interacción entre los grupos terminales  $-NH_2$  y el grupo  $-COOH$  del ibuprofeno. También reportaron que el número de moléculas de fármaco cargado está en función del número de grupos funcionales presentes en la capa externa del dendrímero.

Otro estudio, desarrollado por Chauhan *et al.*, [12] se enfocó en la encapsulación del fármaco indometacina en dendrímeros de PAMAM 4.0G y en la orientación del complejo PAMAM/indometacina en estudios *in vivo* hacia tejidos que se encontraban inflamados (en un modelo animal). La formación del complejo entre el grupo  $-COOH$  de la indometacina y los grupos  $-NH_2$  del dendrímero se confirmó mediante IR. La administración intravenosa de la formulación del complejo en ratas, mostró que la eficacia de focalización del complejo fue 2.29 veces mayor en comparación con el fármaco puro.



Ma *et al.* [24] investigaron el potencial de los dendrímeros de PAMAM 5.0G como nanoacarreadores del fármaco sulfametoxazol mediante estudios de liberación *in vitro* y pruebas de actividad antibacteriana. Los resultados de la liberación *in vitro* mostraron que la liberación del sulfametoxazol en presencia de dendrímeros PAMAM fue más lenta en comparación con el sulfametoxazol puro. Los estudios de microbiología mostraron que los dendrímeros de PAMAM aumentan la actividad antibacteriana del sulfametoxazol (un aumento de 4 a 8 veces) en comparación con el sulfametoxazol puro.

Madaan *et al.* [25] también evaluaron el potencial de los dendrímeros de PAMAM 0.0G, 1.0G, 2.0G y 3.0G, como sistemas de administración, para el fármaco de quercetina, suministrados por la ruta oral. También, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los complejos de PAMAM/quercetina de manera *in vivo*. El estudio *in vitro* reveló un patrón de liberación bifásica de quercetina, que se caracterizó por una liberación inicial rápida seguida de una fase de liberación sostenida. El análisis de FTIR confirmó que la quercetina forma complejos con todas las generaciones de los dendrímeros de PAMAM estudiadas. Además, se descubrió que los complejos mejoran la actividad antiinflamatoria en ratas en comparación con la formulación de quercetina pura.

### **1.1.3. Polímeros de polisacáridos para la administración de fármacos dirigida al colon**

Los sistemas de administración de fármacos a base de polímeros de polisacáridos, como la goma guar, se utilizan ampliamente para el suministro de medicamentos en el colon. La orientación de los fármacos al colon a través de polisacáridos protege al medicamento de su degradación, y liberación en el estómago y el intestino delgado. También asegura la liberación del fármaco en los alrededores del colon [26].

Krishnaiah *et al.* [27] evaluaron un sistema de administración de fármacos para el colon basado en un polisacárido, la goma guar. Realizaron estudios *in vivo* de gammagramas en voluntarios humanos utilizando tecnecio-99m-DTPA como marcador y recubiertos con la goma. Las gammagrafías mostraron que cierta cantidad del marcador de las tabletas se liberó en el estómago y en el intestino delgado pero la mayor parte del marcador se liberó en el colon. Se encontró que el tiempo de llegada de las tabletas al colon

era de 2 a 4 h. También se observó, que al entrar en el colon las tabletas se degradaron (en cinco de cada seis voluntarios) liberando así una mayor cantidad del marcador.

En otro estudio realizado por Krishnaiah *et al.* [28] se evaluó la farmacocinética de tabletas de mebendazol recubiertas con goma guar de manera *in vivo* en voluntarios humanos. Los resultados del estudio indicaron que las tabletas de mebendazol a base de goma guar no liberaron el medicamento en el estómago y el intestino delgado, sino que liberaron el medicamento hasta llegar colon, que resultó en una absorción lenta del medicamento.

Tugcu-Demiroz *et al.* [18] elaboraron tabletas de mesalazina y se recubrieron mediante compresión con diferentes tipos de goma guar. Los comprimidos se analizaron *in vitro* para determinar la liberación del fármaco. También, se realizaron estudios *in vivo* en voluntarios humanos para monitorear las tabletas en todo el tracto gastrointestinal mediante rayos X. Los resultados *in vitro* confirmaron que el recubrimiento a base de goma guar puede proteger al medicamento contra el gradiente de pH del tracto gastrointestinal. Por otra parte, los resultados *in vivo* mostraron que las tabletas recubiertas con goma guar alcanzaron el colon sin desintegrarse (en todos los voluntarios).

Ji *et al.* [16] evaluaron el potencial de la goma guar como material de recubrimiento para el suministro del 5-fluorouracilo en el colon. En este estudio, el fármaco se recubrió con goma guar en un equipo de lecho fluidizado. Se realizaron estudios de liberación *in vitro* en PBS a diferentes valores de pH y con contenido cecal de rata, además de estudios *in vivo* en perros. Los estudios *in vitro* revelaron que los recubrimientos de goma guar protegían el fármaco hasta que éstos eran degradados por las enzimas del contenido cecal; los resultados *in vivo* mostraron un comportamiento similar al llegar al colon.

Chaurasia *et al.* [29] prepararon microesferas de goma guar que contenían metotrexato. La liberación *in vitro* del fármaco se investigó utilizando medios fisiológicos que simulaban el tracto gastrointestinal con contenido cecal de rata. También, realizaron estudios de liberación *in vivo* donde se administraron, por vía oral, las micropartículas con fármaco, así como una suspensión del fármaco puro a ratas. En los estudios de liberación *in vitro* una pequeña cantidad del fármaco se liberó en los medios que simulaban el estómago y el intestino, mientras que el mayor porcentaje del fármaco (91 %) se liberó en el medio con contenido cecal. Los resultados de los estudios de liberación *in vivo* demostraron que

las microesferas son capaces de retardar la liberación del metotrexato hasta que llega al colon, reportaron que las microesferas de goma guar liberaron la mayor parte de su carga (79 %) en el colon, mientras que las suspensiones de fármaco puro liberaron sólo el 23% de su dosis total en el mismo sitio.

## **1.2. Cronología de los sistemas de administración de fármacos**

Los sistemas de administración de fármacos se desarrollaron para proporcionar una forma más eficaz de administrar el medicamento. El componente más importante en cualquier formulación es el fármaco. Los demás componentes, conocidos como excipientes, en una formulación se utilizan para hacer que el fármaco sea administrado de manera más eficaz. Antes de 1950 todos los medicamentos se convertían en píldoras o cápsulas que liberaban el fármaco inmediatamente al entrar en contacto con el agua sin ninguna capacidad de controlar la cinética de liberación. En 1952, Smith Klein Beecham introdujo la primera formulación de liberación sostenida, conocida como Spansule, la cual fue capaz de controlar la cinética de liberación del fármaco a un ritmo predeterminado [16].

La tecnología moderna de administración de fármacos tiene aproximadamente 70 años, durante este período se han desarrollado numerosos sistemas para el suministro de medicamentos, clasificados en tres generaciones en función de las intenciones planteadas al momento de su desarrollo. En la primera generación (1950-1980) se desarrollaron principalmente sistemas orales y transdérmicos. Durante este período se identificaron cuatro mecanismos de liberación que aceleraron el desarrollo de varias formulaciones: disolución, difusión, osmosis e intercambio iónico. Los mecanismos más utilizados fueron los sistemas controlados por disolución y difusión. En esta generación, la determinación de las propiedades fisicoquímicas; por ejemplo, la cinética de liberación de fármacos *in vitro*, fue suficiente para desarrollar formulaciones clínicamente útiles. Durante este periodo, no se identificaron barreras biológicas, excepto por la incapacidad de superar el tiempo de tránsito gastrointestinal y las diferentes propiedades de absorción que presentan diferentes segmentos del tracto gastrointestinal [16].

Durante la segunda generación (1980-2010) se desarrollaron formulaciones donde el fármaco se cargaba dentro de nanopartículas, con el propósito de lograr un mejor control cinético de la liberación del medicamento; por ejemplo, alcanzar una cinética de orden

cero, donde el fármaco pueda liberarse de manera constante. En la segunda generación, también se utilizaron nanopartículas modificadas superficialmente con péptidos y/o proteínas que permiten el reconocimiento molecular de un sitio determinado conocido “diana terapéutica”, la cual puede ser un órgano, una célula, un compartimento celular o incluso un organelo. Además, en esta generación también se incluyen los sistemas denominados “inteligentes” los cuales son sensibles a distintos estímulos; por ejemplo, polímeros sensibles al pH o a la temperatura, así como un grupo de partículas que se activan por factores externos, como el ultrasonido, luz infrarroja, estímulos de radiofrecuencia, campos magnéticos, entre otros [16].

La última década de la segunda generación (2000~2010) se enfocó en la administración de fármacos en tumores. Las nanopartículas se administraban con la intención de alcanzar un tumor como sitio diana, donde se ven forzadas a acumularse debido a un efecto de “permeabilidad y retención aumentada (EPR)”. El poco éxito clínico que tuvo esta generación se debe, en gran parte, a la dificultad por superar las respuestas corporales después de que los sistemas de fármacos se administran. Estos sistemas, por muy inteligentes que hayan sido construidos, no fueron capaces de hacer frente a los desafíos generados por el entorno biológico [16].

Finalmente, los sistemas de administración de fármacos de tercera generación (2010~2040), son sistemas que se enfocan en superar las barreras tanto fisicoquímicas como biológicas de las generaciones pasadas, así como dirigirse hacia una determinada diana, y mejorar la cinética de liberación. Básicamente, los sistemas de este periodo combinan propiedades de las dos generaciones anteriores, centrándose en un diseño de sistemas capaces de realizar funciones más complejas. Algunos de los problemas fisicoquímicos de la primera generación que aún se deben superar, son la escasa solubilidad en agua de los fármacos y la dificultad de controlar la cinética de liberación del medicamento. Entre las barreras biológicas a superar, determinadas en la segunda generación, se encuentra la distribución de nanopartículas en sitios no deseados. Tales barreras reducen significativamente la probabilidad de llegar a los tejidos diana con una concentración del fármaco suficiente para obtener la eficacia terapéutica [16].

### 1.3. Sistemas de liberación de fármacos

La administración de fármacos es el proceso donde un compuesto farmacéutico es suministrado y liberado en el cuerpo humano para lograr los efectos terapéuticos deseados. Los compuestos farmacéuticos pueden ser: productos químicos, péptidos, anticuerpos, vacunas y/o fármacos. Los métodos convencionales de administración (por ejemplo: dosificación oral, inyectable, transdérmica, etc.) son eficaces en la mayoría de los fármacos; sin embargo, algunos de ellos son inestables, tóxicos y/o poseen problemas de solubilidad. En tales casos, es deseable un método de liberación continua que mantenga los niveles constantes del fármaco en la sangre. En función de la forma en que liberen el medicamento, los sistemas de administración de fármacos se pueden clasificar en diferentes categorías, algunas de éstas son las siguientes [30]:

- (i) Sistema de liberación sostenida: Estos sistemas son aquellos que logran una liberación lenta durante un período de tiempo prolongado.
- (ii) Sistema de liberación retardada: Se considera un sistema de liberación retardada cuando el fármaco no se libera inmediatamente después de ser administrado sino al cabo de un tiempo preestablecido.
- (iii) Sistema de liberación controlada: Si el sistema logra mantener un nivel constante del fármaco en la sangre o en el sitio deseado, se considera un sistema de liberación controlada.
- (iv) Sistema de liberación prolongada: En los sistemas de liberación prolongada el fármaco se libera de forma más lenta que en la liberación convencional, de manera que la concentración del fármaco en la sangre permanece más tiempo.
- (v) Sistema de liberación específica: En estos sistemas, el fármaco es orientado y liberado en una determinada ubicación biológica. Generalmente, para liberar los medicamentos de manera específica, se utilizan nanopartículas que protegen y transportan al fármaco hasta la ubicación deseada. Las nanopartículas a menudo tienen un receptor que orienta a la partícula específicamente al sitio deseado (diana terapéutica).

#### 1.4. Tipos de nanoacarreadores en la administración de fármacos

El desarrollo de nanoestructuras para la liberación de fármacos, conocidos como nanoacarreadores (también denominados vectores), ha ido evolucionando con la nanotecnología y la biotecnología. A través de la manipulación de las propiedades de los materiales se han podido generar nanoestructuras donde el fármaco puede ser encapsulado, atrapado, adsorbido o unido químicamente a la nanoestructura. Estos nanosistemas se clasifican en dos grandes grupos [31]:

(a) Nanosistemas inorgánicos (Figura 1.1a): En este grupo se encuentran las nanopartículas metálicas, nanopartículas cerámicas y nanomateriales de carbono.

(b) Nanosistemas orgánicos (Figura 1.1b): En esta clasificación se encuentran las nanopartículas poliméricas, liposomas, micelas poliméricas, nanopartículas de lípidos sólidos y los dendrímeros.

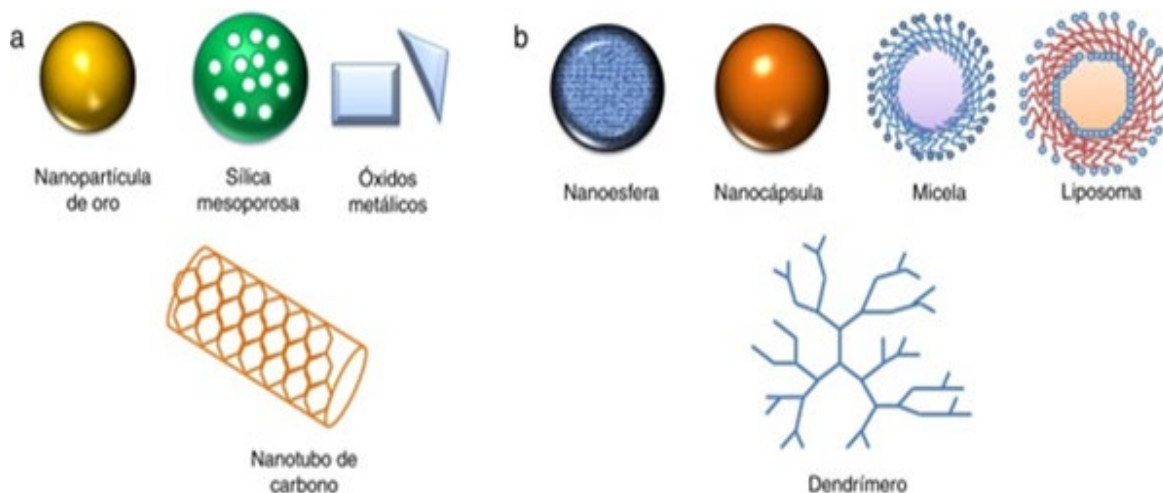


Figura 1.1 Nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos (a) inorgánicos y (b) orgánicos [31].

#### 1.5. Dendrímeros

Los dendrímeros (Figura 1.2) son macromoléculas que se caracterizan por tener una arquitectura híper-ramificada. Poseen tres componentes arquitectónicos característicos: (i) un núcleo, (ii) capas intermedias que se conocen como “generación” (G) que se componen de unidades repetitivas llamadas dendrones, y (iii) una capa externa llena de grupos

funcionales. En el caso de los dendrímeros de PAMAM, el núcleo a veces se denomina “generación -0.5G”, los compuestos intermedios que presentan grupos éster en la capa externa se conocen como dendrímeros de “media generación” (por ejemplo: 0.5G, 1.5G, etc.) mientras que aquellos que contienen grupos amina en la superficie se denominan dendrímeros de “generación completa” (por ejemplo: 0.0G, 1.0G, etc.). Esta arquitectura de núcleo-capa en los dendrímeros de PAMAM crece en función de las capas añadidas, mientras tanto, el número de grupos funcionales en la superficie, así como el peso molecular incrementan en aproximadamente el doble de la generación anterior (ver Tabla 1) [32–34].

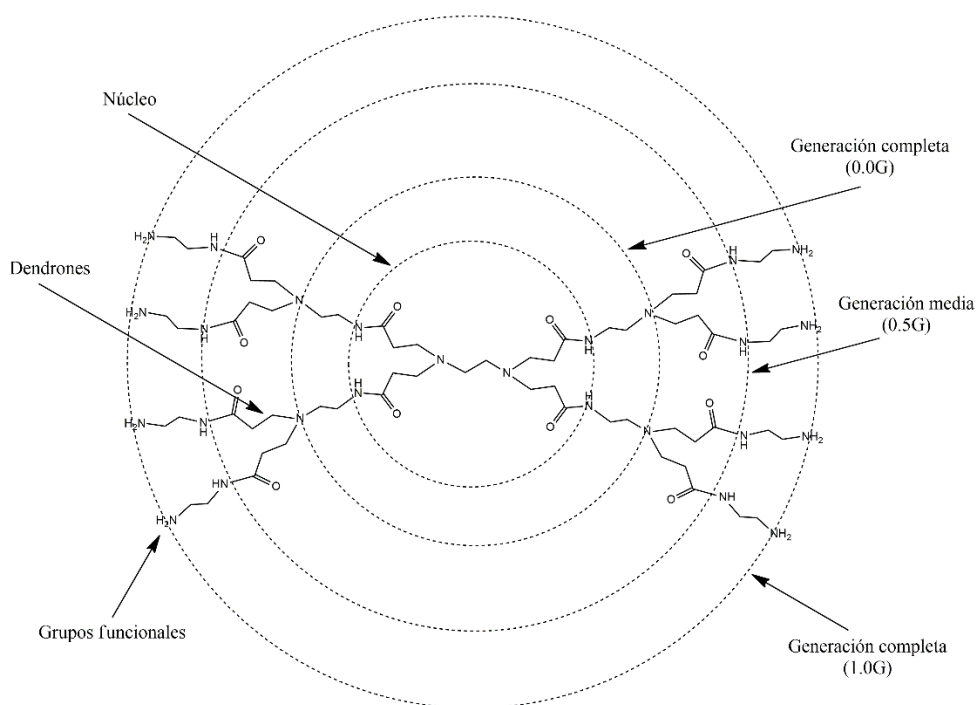


Figura 1.2 Componentes de un dendrímero de PAMAM.

Tabla 1.1 Propiedades teóricas de los dendrímeros de PAMAM.

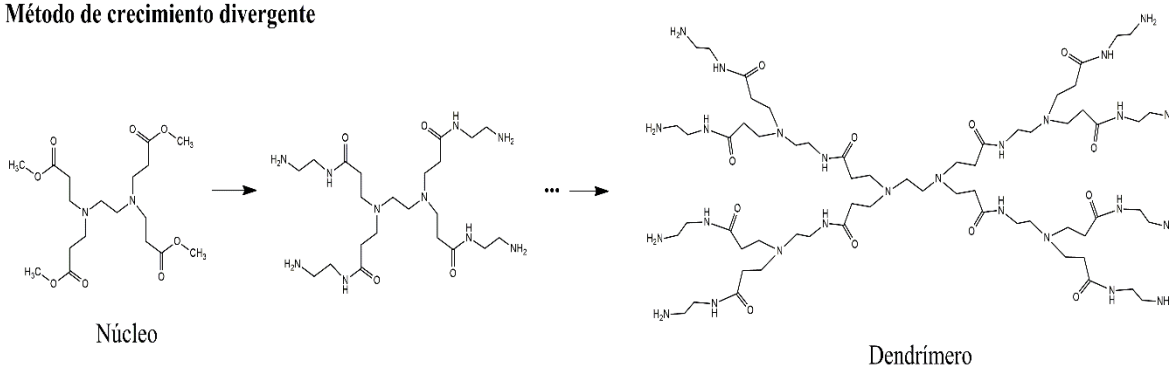
Generación	Peso molecular (g/mol)	Diámetro (nm)	Grupos en la superficie
0	517	1.5	4
1	1430	2.2	8
2	3256	2.9	16
3	6909	3.6	32

4	14215	4.5	64
5	28826	5.4	128

Desde 1979 se han utilizado dos métodos para la síntesis de dendrímeros; el primero fue introducido por Tomalia y se denomina "método divergente", en el cual el crecimiento del dendrímero se origina a partir de un núcleo, el segundo método fue iniciado por Hawker y Fréchet, y se conoce como "método convergente", en el cual varios dendrones reaccionan con un núcleo para obtener el dendrímero final [19,32]. En el método de crecimiento divergente, la construcción del dendrímero se realiza mediante reacciones de polimerización por etapas. Los dendrímeros se producen alternando entre dos reacciones de manera secuencial. Estas reacciones consisten en (a) una alquilación de aminas primarias con acrilato de metilo y (b) una amidación de los grupos éster con etilendiamina; ambas reacciones crean la primera capa completa de la serie de dendrímeros conocida como generación cero (0.0G). Posteriormente, estas dos reacciones se repiten hasta que se obtiene el dendrímero de generación deseada. La Figura 1.3 muestra una representación esquemática del crecimiento divergente [19,32].

Por otro lado, el crecimiento convergente comienza en lo que terminará siendo la superficie del dendrímero. Para obtener una estructura dendrítica, se hacen reaccionar varios dendrones con un núcleo para así producir un dendrímero completo (ver Figura 1.4) [19,32].

#### Método de crecimiento divergente





### Método de crecimiento convergente

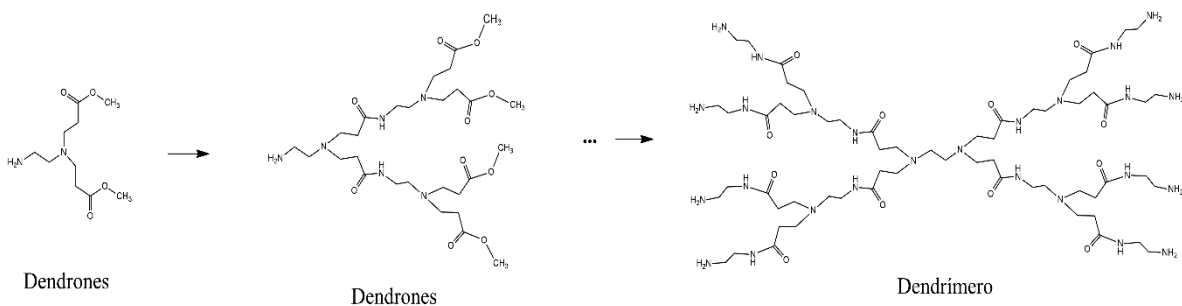


Figura 1.3 Método de crecimiento divergente y convergente de dendrímeros.

Los dendrímeros poseen varias características importantes en comparación con otras formas arquitectónicas de polímeros (por ejemplo: polímeros lineales y entrecruzados). Tienen una estructura bien definida, polidispersidad estrecha, rango de tamaño nanométrico, presentan baja solubilidad en agua, baja citotoxicidad (cuando la capa externa tiene grupos aniónicos). Además, son capaces de albergar varias moléculas (por ejemplo: péptidos, proteínas y/o fármacos) en el interior o en la periferia, a través de la formación de complejos y conjugados, respectivamente [32–35].

En los complejos de dendrímero/fármaco (Figura 1.4) el fármaco se encuentra atrapado en la cavidad interna del dendrímero. El fármaco, también puede estar interactuando en la superficie del dendrímero donde se estabiliza mediante fuerzas intermoleculares como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Así mismo, los complejos de dendrímero/fármaco pueden proteger a los medicamentos contra el entorno biológico, lo cual es beneficioso para que el fármaco sea transportado a la diana terapéutica y evitar que se metabolice durante el recorrido [32–34].

Por otra parte, en un conjugado de dendrímero/fármaco (Figura 1.4) el fármaco se encuentra unido covalentemente a los grupos periféricos del dendrímero. La unión covalente de un fármaco en la superficie del dendrímero ofrece distintas ventajas sobre los complejos de dendrímero/fármaco; esto se debe, a que el enlace hidrolizable o biodegradable entre dendrímeros y fármacos, proporciona un mejor control sobre la liberación del fármaco en comparación con los complejos. Para mejorar la eficacia de los conjugados de dendrímero/fármaco, es necesario controlar la liberación del medicamento desde el dendrímero en la diana terapéutica. Esto se puede lograr mediante la orientación de la nanopartícula con una molécula señalizadora (por ejemplo: proteínas y/o anticuerpos). La

principal desventaja de los conjugados de dendrímero/fármaco se debe, a que se requiere que las moléculas del fármaco se escindan en el tiempo y el entorno específico, lo cual es bastante difícil de lograr [32–34].

Las propiedades únicas que poseen los dendrímeros de PAMAM han contribuido a hacer que estas nanopartículas sean interesantes para aplicaciones biológicas, en particular, para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos.

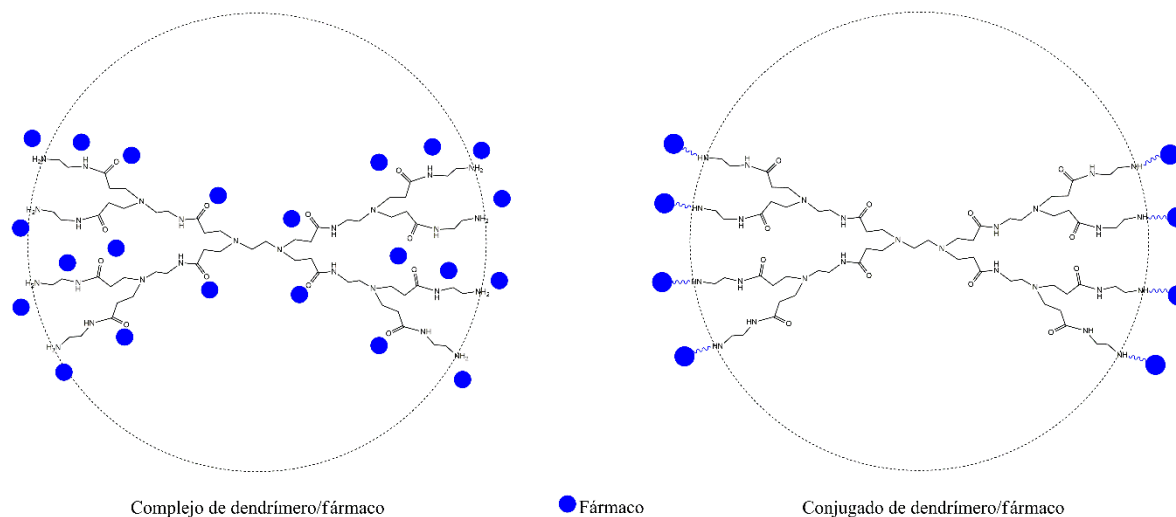


Figura 1.4 Complejo y conjugado de dendrímero/fármaco.

## 1.6. Nanopartículas en terapias contra el cáncer

La nanomedicina, la aplicación de la nanotecnología en la medicina, tiene como objetivo detectar marcadores tumorales y al mismo tiempo elaborar nanopartículas usando los mismos biomarcadores que se encuentran en el tumor del paciente, portando así un fármaco específico diseñado para combatir ese tumor. Los biomarcadores del cáncer pueden ser moléculas, como ARN, proteínas, lípidos, carbohidratos y pequeñas moléculas de metabolitos. De este modo, la nanotecnología se puede utilizar para el desarrollo de nanopartículas multifuncionales que pueden detectar, obtener imágenes de tumores, además de monitorear el progreso del tratamiento [36].

Las nanopartículas se han convertido en un área importante de investigación en el campo de la administración de fármacos, ya que tienen la capacidad de administrar el fármaco en el área deseada durante un período sostenido de tiempo. Las nanopartículas

pueden acumularse en los tumores debido al efecto permeabilidad y retención aumentada (EPR). La acumulación de nanopartículas es posible debido a formación vasos sanguíneos (angiogénesis) altamente permeables que nutren el área tumoral. Además, los tumores se caracterizan por un drenaje linfático disfuncional que ayuda a la retención de nanopartículas en el tumor, prolongando su permanencia en el tejido durante el tiempo suficiente para permitir la desintegración de las nanopartículas y la liberación del fármaco cerca de las células tumorales [36].

En aplicaciones clínicas, la ventaja de las nanopartículas es que pueden albergar y/o conjugarse fácilmente con muchas biomoléculas como aminoácidos, proteínas, péptidos y fármacos, así como otras especies moleculares, sin alterar la actividad biológica de las especies incorporadas. Estos mecanismos se han utilizado ampliamente para albergar distintos tipos fármacos anticancerígenos en las nanopartículas, tales como metotrexato, doxorubicina y 5-fluoruracilo [36].

### **1.7. 5-fluorouracilo (5-FU)**

El 5-fluorouracilo es un fármaco anticancerígeno que pertenece al grupo de las fluoropirimidinas. Es un tipo de antimetabolito que se administra para el tratamiento de distintos tipos de cáncer; por ejemplo: estomago, mama, estómago, páncreas y/o colon. Químicamente, es un análogo del uracilo en donde un átomo de flúor sustituye a un átomo de hidrógeno en la posición del carbono 5 (ver Figura 1.5). Su mecanismo de acción consiste en incorporarse en el ADN y ARN de las células cancerosas, inhibiendo procesos biosintéticos esenciales de las células y ocasionando que pierdan la capacidad de dividirse [13]. Actualmente, solo están disponibles formulaciones intravenosas del 5-FU para uso clínico y se ha reportado que causan efectos secundarios gastrointestinales, dermatológicos, hematológicos, cardíacos y neurológicos, debido a una mala distribución del fármaco en zonas no tumorales [13]. Los sistemas de administración específicos para el colon podrían lograr una administración focal del 5-FU, mejorando su farmacoterapia y disminuyendo sus efectos secundarios.

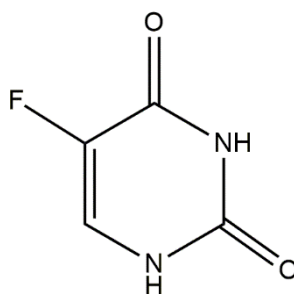


Figura 1.5 Estructura química del 5-fluorouracilo.

### **1.8. Fisiología del tracto gastrointestinal y estrategias para administrar medicamentos en el colon**

Hasta la fecha, la vía oral sigue siendo la ruta preferida para el suministro de fármacos, especialmente en padecimientos crónicos donde se requiere una administración constante del medicamento. Sin embargo, esta vía no es adecuada para la administración de algunos fármacos, debido a la presencia de enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal, absorción deficiente y capacidad limitada para transportarse a través del tracto gastrointestinal [26,37].

El tracto gastrointestinal, también llamado canal alimentario, es un tubo digestivo que se extiende a través del cuerpo (Figura 1.7). Cuenta con una amplia área para digerir alimentos, absorber nutrientes, electrolitos y líquidos y, además nos protege de sustancias potencialmente dañinas. Para realizar estas funciones, el tracto se divide en órganos que poseen características únicas a lo largo de su longitud [26,37].

El intestino delgado es la parte más larga del tracto gastrointestinal, aquí se produce la mayor parte de la digestión enzimática y prácticamente toda la absorción. En el intestino, los materiales digeridos contienen pocos nutrientes, pero los residuos permanecen allí alrededor de 12-24 h. El colon es el sitio con la microflora más abundante en el tracto gastrointestinal, se compone principalmente de bacterias anaerobias, como bacteroides, bifidobacteria, eubacteria y enterobacteria, entre otras. Esta microflora satisface sus necesidades energéticas mediante la fermentación de diversas sustancias que quedan sin digerir en el intestino delgado, como los ditrioligosacáridos y los polisacáridos [26,37].

Cuando se administran fármacos por la ruta oral, estos pasan a través del esófago, el estómago, el intestino delgado y el colon, sucesivamente. El pH en estos sitios varía desde

fuertemente ácido en el estómago (pH 1.5-1.9) hasta casi neutro en el intestino delgado y luego ligeramente ácido (pH 5-7) en el colon. De esta forma, todos los contenidos en el tracto gastrointestinal, gradientes de pH y, tiempos de tránsito desde la boca al colon, pueden dificultar el transporte de los medicamentos al sitio deseado y reducir la eficacia de los fármacos.

Por tal motivo, se deben desarrollar nuevas estrategias para administrar medicamentos en el colon por la vía oral. Estos sistemas de suministro de fármacos deben cumplir con ciertos criterios; en primer lugar, deben permanecer intactos cuando viajan a través del tracto gastrointestinal para proteger a los fármacos incorporados de la degradación química y enzimática, en segundo lugar, deben liberar los fármacos incorporados después de llegar al segmento de colon. Los polímeros de polisacáridos son capaces de cumplir con estos requisitos hasta cierto punto, habiendo demostrado su potencial como materiales de partida para la construcción de sistemas administración oral de fármacos orientados al colon (ver sección 1.1.3) [26,37].

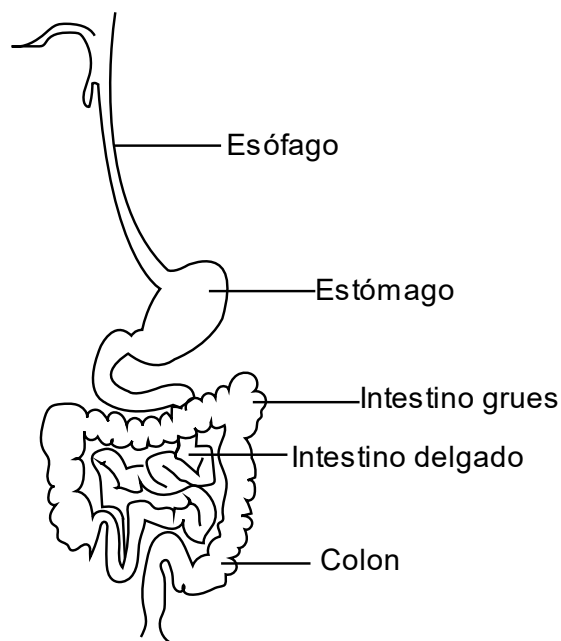


Figura 1.6 Esquema del tracto gastrointestinal.

## 1.9. Polisacáridos

Los polisacáridos se han utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas de liberación específica de fármacos. Estos polímeros, que consisten en azúcares (monosacáridos), son

seguros, económicos, hidrofílicos y no son tóxicos; las pectinas, el almidón, la amilasa, la goma de karaya y la goma guar, son algunos de los polisacáridos utilizados en la liberación de medicamentos [13,17,18].

La goma guar (GG) es un polisacárido de alto peso molecular (220, 000 Daltons) derivado de las semillas de *Cyamopsis tetragonolobus*, familia *Leguminosae*. Está formado por una cadena lineal de  $\beta$ -D-manopiranososa unida por enlaces  $\beta$ -(1-4) con unidades  $\alpha$ -D-galactopiranosilo unidas por enlaces (1-6) (Figura 1.8). En productos farmacéuticos, la GG se utiliza como aglutinante, desintegrante, agente de suspensión, agente espesante y estabilizador. La goma guar se considera un candidato potencial para la administración de fármacos específicos al colon debido a que permanece intacta en el ambiente fisiológico del estómago y el intestino delgado, pero se degrada por una enzima ( $\beta$ -mananasa) que se localiza específicamente en este sitio [13,17,18].

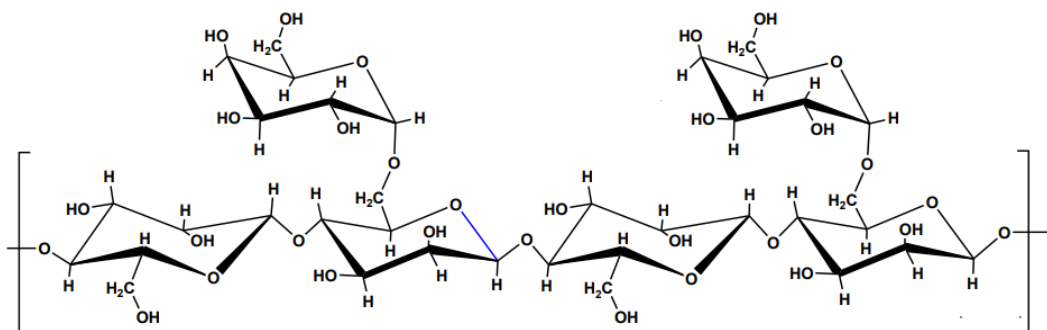


Figura 1.7 Estructura química de la goma guar.

### 1.10. Enzimas

Las enzimas son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas; es decir, modifican la velocidad de reacción. A diferencia de lo que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas en las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas, éstas actúan sobre moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes conocidas como productos. La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Muchos fármacos pueden actuar como inhibidores enzimáticos, disminuyendo o impidiendo la actividad de las enzimas. Igualmente, la

actividad de las enzimas puede ser afectada por la temperatura, el pH, la concentración de la propia enzima y del sustrato, y otros factores fisicoquímicos [38].

En el caso de los polisacáridos, como la goma guar, estos pueden ser descompuestos completamente en azúcares de galactosa y manosa (ver Figura 1.8) por la acción de la enzima  $\beta$ -mananasa. Estas enzimas que degradan a los galactomananos se encuentran en el organismo humano específicamente en el colon [39]. Por lo tanto, un sistema que combine la administración de fármacos mediante nanopartículas con la administración de medicamentos usando polisacáridos, podría liberar de manera específica y controlada los fármacos como el 5-FU en el colon.

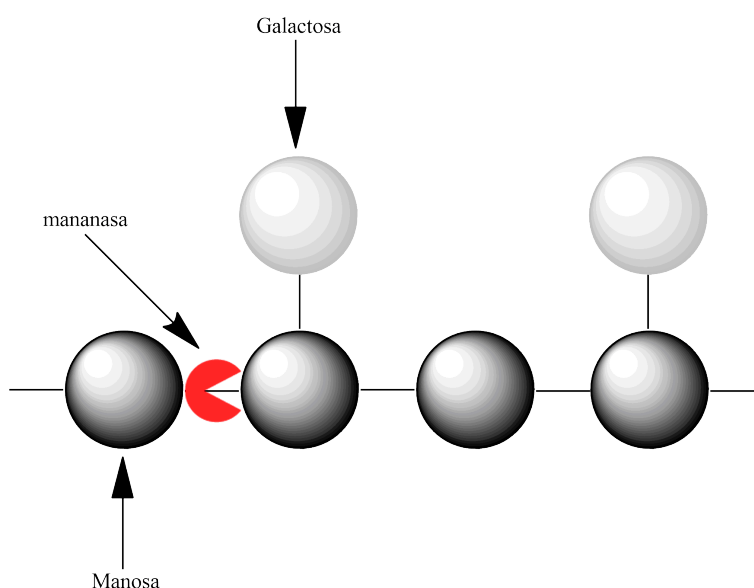


Figura 1.8 Esquema de la degradación enzimática de la GG.

## **HIPÓTESIS**

El recubrimiento de los complejos de PAMAM/5-FU con GG, permitirá obtener un nuevo sistema para la liberación del fármaco 5-FU de manera controlada y específica en el colon.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la viabilidad del sistema a base de complejos de dendrímero/fármaco y goma guar para su potencial uso como sistema de liberación específica y controlada del fármaco 5-FU en el colon.

### **Objetivos específicos**

- Sintetizar dendrímeros de PAMAM por el método de crecimiento divergente.
- Caracterizar fisicoquímicamente los dendrímeros mediante FTIR, UV-vis, RMN-1H, DLS y TGA.
- Elaborar y caracterizar complejos de dendrímero/fármaco.
- Estudiar la cinética de liberación de los complejos dendrímero/fármaco.
- Estudiar el efecto de la concentración de la GG como material de recubrimiento en los sistemas de administración de fármacos a base de dendrímeros.

## CAPÍTULO 2

### 2.1. Materiales

Los dendrímeros de PAMAM se sintetizaron utilizando etilendiamina (EDA, 99% de pureza), acrilato de metilo (MA, 99% de pureza) y metanol (MeOH, grado ACS). La EDA y el MA se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI, USA), el MeOH se adquirió de J.T. Baker (Matsonford Road, Radnor, PA). Todos los productos se utilizaron sin purificación adicional excepto la etilendiamina, la cual se destiló antes de su uso. Los dendrímeros sintetizados formaron complejos con el 5-fluorouracilo, adquirido de Sigma-Aldrich. Los estudios de liberación *in vitro* del 5-FU a partir de los complejos se realizaron en solución búfer de fosfato salino (PBS, 7.4 pH) de Sigma-Aldrich usando tubos de diálisis de celulosa con un corte de peso molecular de 500-1000 Daltons suministrados por Spectral/Por® (Rancho Domínguez, CA, USA.) Para formar tabletas, los complejos de PAMAM/5-FU se recubrieron con goma guar (GG) y celulosa microcristalina (CM) adquiridas de Sigma-Aldrich. Ácido hidroclicórico (HCL, 37% p/p), PBS y una enzima endo-1,4- $\beta$ -mananasa (*Cellvibrio Japonicus*) de Megazyme (Bray, Wicklow, Irlanda) se utilizaron en los estudios de liberación *in vitro* del 5-FU que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal.

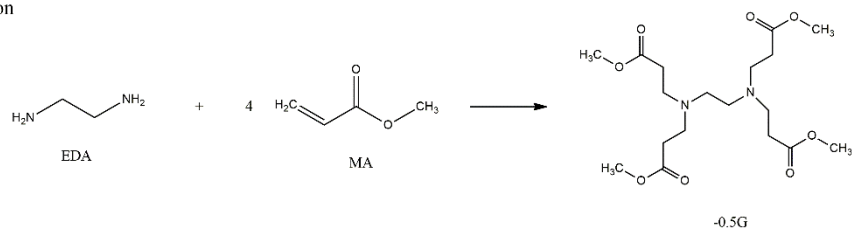
### 2.2. Síntesis de dendrímeros de PAMAM

#### 2.2.1 Procedimiento general

La síntesis de los dendrímeros de PAMAM se llevó a cabo siguiendo el método de crecimiento divergente descrito por Tomalia *et al* [40]. Esta técnica consiste en la alternación de dos reacciones: (i) una reacción de adición nucleofílica (también conocida como reacción de Michael) entre la etilendiamina y el acrilato de metilo que da como resultado un dendrímero con grupos éster en la capa externa denominado “dendrímero de media generación”, y (ii) una reacción de amidación del dendrímero generado en el paso anterior con un exceso de etilendiamina, la cual produce un dendrímero con grupos amina en la capa externa y se conoce como “dendrímero de generación completa” (ver Figura 2.1). Como solvente utiliza un medio metanólico porque durante la reacción se libera

metanol. Estas dos reacciones se repiten consecutivamente hasta llegar a la generación 2.0G. La síntesis detallada de los dendrímeros se describe en las secciones 2.2.2 y 2.2.3.

(a) Michael reaction



(b) Amidation reaction

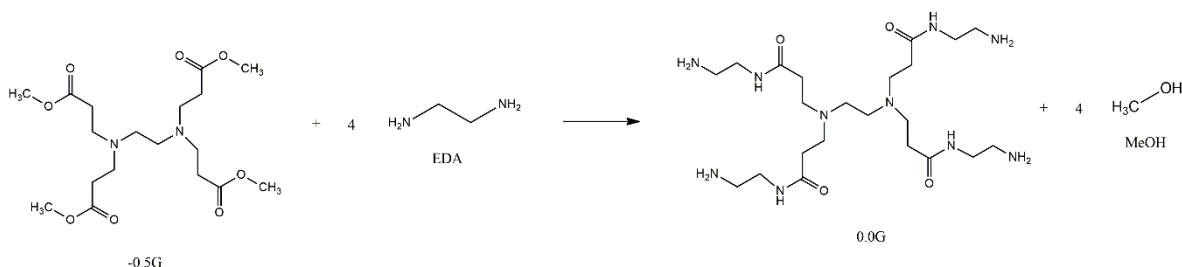


Figura 2.1 Mecanismo de la síntesis de dendrímeros de PAMAM: (a) reacción de Michael y (b) reacción de amidación.

## 2.2.2 Síntesis de dendrímeros de media generación (-0.5G, 0.5G y 1.5G)

En primer lugar, se disolvió acrilato de metilo en metanol y luego se transfirió a un matraz de fonde redondo de tres bocas (ver Figura 2.2). Esta solución se agitó lentamente con agitación magnética en atmósfera de nitrógeno ( $N_2$ ) y se enfrió en un baño de hielo ( $\sim 5^\circ C$ ). En un recipiente aparte se disolvió etilendiamina, o un dendrímtero de generación completa, en metanol (ver Tabla 2.1) y se añadió por goteo a la solución de acrilato utilizando un embudo de adición. Después de completar la adición, la mezcla final se agitó durante 24 h a temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ C$ ). El exceso de acrilato de metilo y metanol se eliminó por destilación al vacío en un evaporador rotatorio. Finalmente, el producto obtenido se secó en una estufa de vacío a  $45^\circ C$  durante 24 h [40].

## 2.2.3 Síntesis de dendrímeros de generación completa (0.0G, 1.0G y 2.0G)

En el segundo paso, se añadió etilendiamina disuelta en metanol a un matraz de tres bocas y se agito a  $5^\circ C$  bajo atmosfera de  $N_2$ . Luego, el dendrímtero de media generación obtenido

en el paso anterior se disolvió en metanol y se añadió gradualmente a la solución de amina. La solución se agitó a 5 °C hasta completar la adición y, después se dejó reaccionar a 25 °C durante 4 días. El reactivo en exceso, EDA, y el disolvente, MeOH, se removieron por destilación a presión reducida; en algunas ocasiones fue necesario utilizar tolueno para eliminar completamente la amina. El producto obtenido se disolvió en agua bidestilada, se dializó y luego se liofilizó [40,41]. En la Tabla 2.1 se muestra un resumen de las concentraciones utilizadas en la síntesis de los dendrímeros de PAMAM. Algunas recomendaciones importantes se discuten en la sección de nexos I.

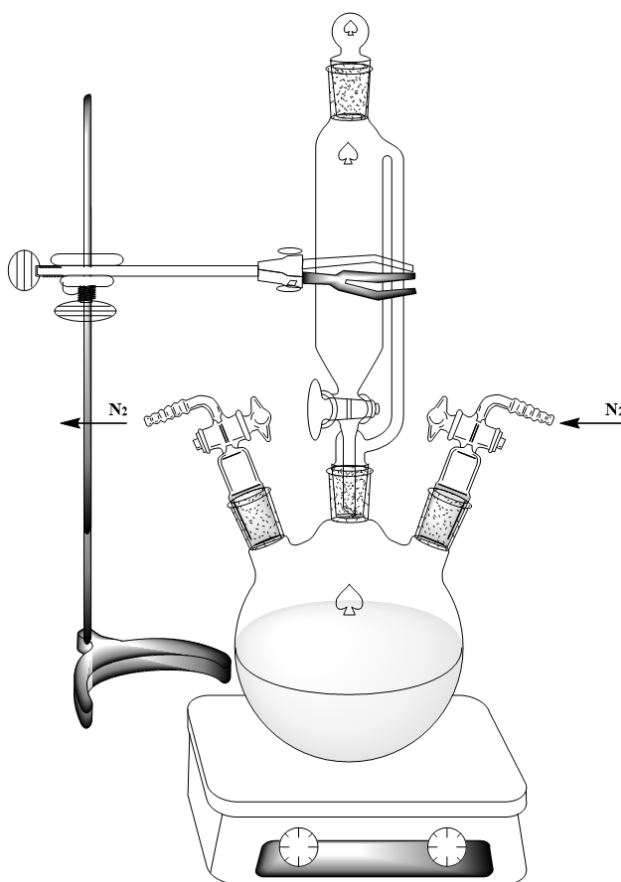


Figura 2.2 Esquema del proceso síntesis de dendrímeros de PAMAM.

Tabla 2.1 Cantidades utilizadas en la síntesis de dendrímeros de PAMAM.

<b>Generación</b>	<b>Monómeros</b>	<b>EDA (mmol)</b>	<b>MA (mmol)</b>
<b>-0.5G</b>	EDA – MA	37.4	187.1
<b>Generación</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Dendrímero (mmol)</b>	<b>Monómero (mmol)</b>

<b>0.0G</b>	-0.5G – EDA	24.7	1236.2
<b>0.5G</b>	0.0G – MA	11.6	116.1
<b>1.0G</b>	0.5G – EDA	6.6	663.6
<b>1.5G</b>	1.0G – MA	4.1	839.2
<b>2.0G</b>	1.5G – EDA	2.8	566.9

### 2.3. Caracterización de los dendrímeros de PAMAM

#### 2.3.1 Pruebas de color y de solubilidad

Los dendrímeros de PAMAM se caracterizaron mediante una reacción de color con sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) según la metodología reportada por Sing *et al* [6]. Para diferenciar entre los dendrímeros de media generación (-0.5G, 0.5G y 1.5G) y los de generación completa (0.0G, 1.0G y 2.0G) se agitó una gota de cada dendrímero con una solución acuosa de  $\text{CuSO}_4$  al 1% p/v.

Los parámetros de solubilidad se determinaron de acuerdo con el procedimiento establecido en la norma ASTM D 3132-84 [42], con algunos cambios. En el experimento, una gota de cada dendrímero se agitó con diferentes disolventes durante 1 h a 25 °C, y luego se dejaron reposar hasta alcanzar el equilibrio. Por último, se realizaron inspecciones visuales para evaluar la solubilidad.

#### 2.3.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos se obtuvieron con un espectrómetro Nicolet 8700 de Thermo Scientific (Madison, WI, USA). Para realizar la prueba, una gota de cada dendrímero se depositó sobre pastillas de bromuro de potasio (KBr). Los espectros se obtuvieron en el rango de número de onda de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y un promedio de 100 barridos.

#### 2.3.3 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis)

Los análisis de UV-vis se realizaron en un espectrofotómetro AE-UV1608 de A&E Lab (Hongde Road, Guangzhou, China). Los dendrímeros se disolvieron en agua bidestilada a

una concentración de 10% p/v y se analizaron en el rango de longitud de onda de 190-400 nm con intervalos de 2 nm usando celdas de cuarzo.

#### **2.3.4 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-1H)**

Los espectros de RMN de protón se obtuvieron a temperatura ambiente con un espectrómetro VNMRS de 600 MHz de Varian (Palo Alto, CA, USA). Los análisis se realizaron disolviendo 20 mg de cada dendrímero en 1 mL de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

#### **2.3.5 Dispersión de luz dinámica (DLS)**

Los análisis de DLS se llevaron a cabo a través de un Nanotracs Wave II de Microtrac (Montgomeryville, PA, USA). Las mediciones de tamaño se realizaron a partir de soluciones acuosas de dendrímero al 10% p/p utilizando un índice de refracción de 1.33 a 25 °C; se realizaron tres mediciones por cada muestra.

#### **2.3.6 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Las temperaturas de descomposición térmica ( $T_d$ ) se calcularon utilizando un analizador termogravimétrico TGA-7 de Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA). Muestras de 5-10 mg de cada dendrímero se calentaron en un intervalo de temperatura de 45 a 600 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno.

### **2.4. Caracterización del 5-FU**

Los análisis de FTIR y UV-vis del 5-fluorouracilo se realizaron con los espectrofotómetros Nicolet 8700 y AE-UV1608, respectivamente. El análisis termogravimétrico se llevó a cabo a través de un analizador TGA-7. La morfología de las partículas del fármaco se observó en un microscopio electrónico de barrido JSM-6360 LV de JEOL.

Los complejos de PAMAM/5-FU se prepararon mezclando soluciones que contenían el fármaco con diferentes soluciones de dendrímero en diferentes proporciones molares de dendrímero/fármaco: 0.0G (1:4), 0.5G (1:8), 1.0G (1:8), 1.5G (1:16) y 2.0G (1:16); en todas las formulaciones se utilizaron 5 mg de fármaco y 10 mL de agua bidestilada (ver Figura 2.3). Las proporciones molares se establecieron a partir de estudios previos donde se

observó que la carga máxima del fármaco depende del número de ramificaciones de la generación del dendrímico [8,25]. Las soluciones de dendrímico/fármaco se agitaron a 100 rpm durante 24 h en una placa de agitación a 25 °C. Luego, los complejos se transfirieron a tubos de diálisis de 500 Da y se dializaron dos veces en 100 mL de agua durante 10 min para eliminar el fármaco que no se cargó. Después de la diálisis, se recolectaron alícuotas y se determinó indirectamente por UV-vis la cantidad de fármaco cargado en los diferentes dendrímeros. Finalmente, las muestras se liofilizaron para obtener los complejos de PAMAM/5-FU. Se obtuvieron cinco complejos de dendrímico/fármaco: 0.0G/5-FU, 0.5G/5-FU, 1.0G/5-FU, 1.5G/5-FU y 2.0G/5-FU.

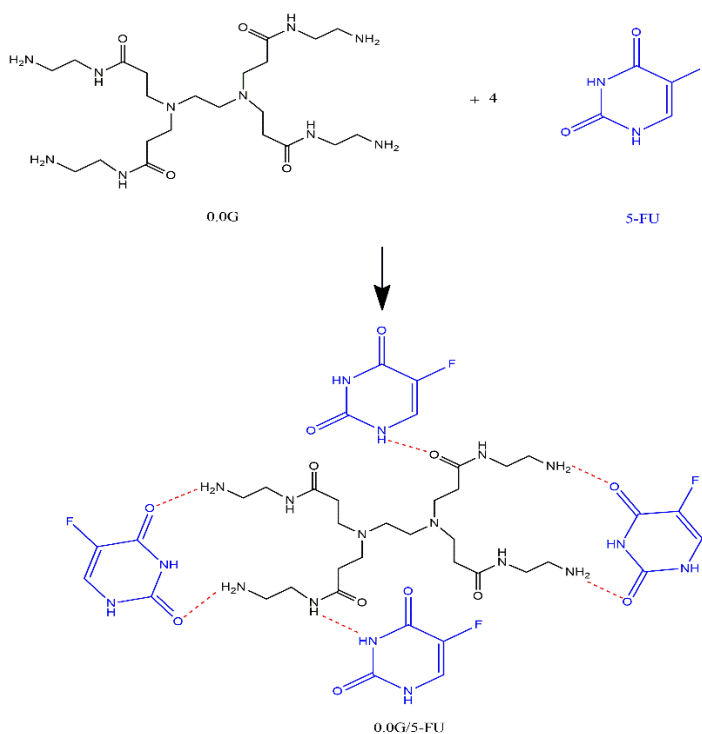


Figura 2.3 Mecanismo de la formación de complejos de PAMAM/5-FU.

## 2.5. Caracterización de los complejos de dendrímico/fármaco (PAMAM/5-FU)

### 2.5.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de FTIR de los complejos se realizó en un espectrómetro Nicolet 8700. Los espectros se obtuvieron mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) usando un

crystal de seleniuro de zinc, en un rango espectral de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , con 100 barridos y una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.5.2 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis)**

Los espectros UV-vis de los complejos se obtuvieron con un espectrofotómetro AE-UV1608. Las muestras se disolvieron en agua bidestilada al 1% p/v y se analizaron en un rango de longitud de onda de 190 a 400 nm con intervalos de 2 nm usando celdas de cuarzo.

### **2.5.3 Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo TGA-7. Aproximadamente 5 mg de cada complejo se calentaron de 50 a 600  $^{\circ}\text{C}$ , con una rampa de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y una atmósfera de  $\text{N}_2$ .

### **2.5.4 Microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDX) y mapeo de elementos**

La composición química de los complejos se determinó mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X con un sistema acoplado al microscopio electrónico de barrido JSM-6010PLUS/LA de JEOL (Tokio, Japón) operando a 10 kV. El análisis se realizó en diferentes áreas ( $n=5$ ) permitiendo la cuantificación de todos los elementos existentes. Adicionalmente, se realizó un mapeo de elementos con un sistema Oxford Inca Energy 200 (Abingdon, UK) acoplado a un SEM JSM-6360 LV de JEOL. Antes de los análisis, las muestras se depositaron sobre cilindros de aluminio utilizando una cinta de cobre de doble cara y luego se recubrieron con una capa delgada de oro en un sistema de recubrimiento por pulverización catódica Denton Vacuum Desk-II (Moorestown, NJ, USA) durante 1 min.

### **2.5.5 Microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión (SEM-TEM)**

La morfología de los complejos se observó en un microscopio electrónico de barrido JSM-6360 LV de JEOL. El estudio se realizó a un voltaje de aceleración de 20 kV con magnificaciones de 1000x; previo al estudio, las muestras se recubrieron con oro en un



sistema Denton Vacuum Desk-II. Además, los complejos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM1010 JEOL con magnificaciones de 30x.

## **2.6. Estudios de liberación del 5-FU a partir de los complejos de PAMAM/5-FU**

### **2.6.1. Determinación del fármaco encapsulado**

Para estimar la cantidad del 5-FU incorporada en los distintos dendrímeros se utilizó un espectrofotómetro modelo AE-UV1608. Primero, se preparó una solución acuosa de 5-FU al 1% p/v y se registró el espectro de absorción de 190 a 400 nm para obtener las señales del fármaco. Se observaron dos picos de absorbancia en la región UV a  $\lambda = 208$  y  $\lambda = 264$  nm (ver Figura 2.4); para la cuantificación del 5-FU, se usó el pico de absorción a  $\lambda = 264$  nm, como se ha reportado previamente por otros autores [6].

Posteriormente, se preparó una curva de calibración del 5-fluorouracilo en agua destilada a diferentes concentraciones utilizando el pico de absorbancia específico del fármaco a  $\lambda = 264$  nm. La curva de calibración obtenida fue lineal en un rango de concentración de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  con un valor de correlación  $r^2 = 0.9994$ , tal como se observa en la Figura 2.5.

Después de recuperar los sobrenadantes del proceso de diálisis (ver sección 2.4) se analizaron por espectroscopia de UV-vis para determinar su absorbancia. Esta absorbancia se correlacionó con la curva de calibración y se determinó la cantidad de 5-FU. Dado que se conocía la cantidad inicial del fármaco (es decir: 5 mg), la cantidad de fármaco encapsulado se calculó como la diferencia entre la cantidad inicial de 5-FU incorporada en los dendrímeros y el fármaco contenido en los sobrenadantes.

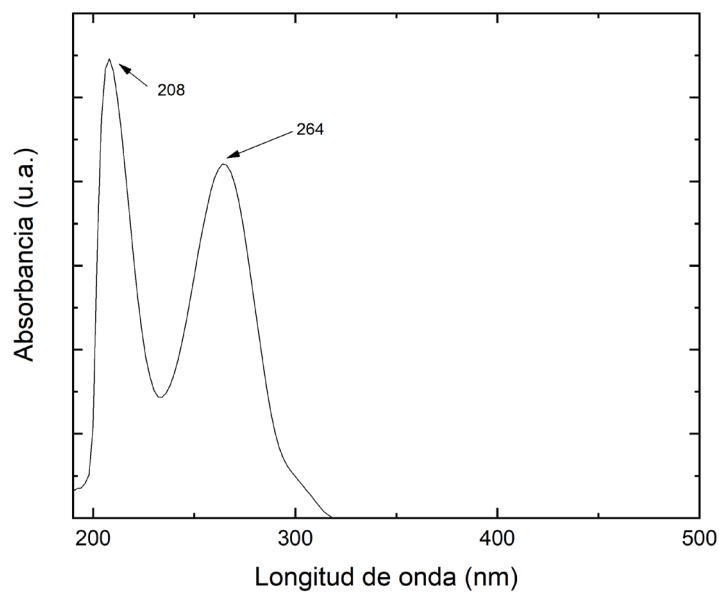


Figura 2.4 Espectro UV-vis del 5-FU.

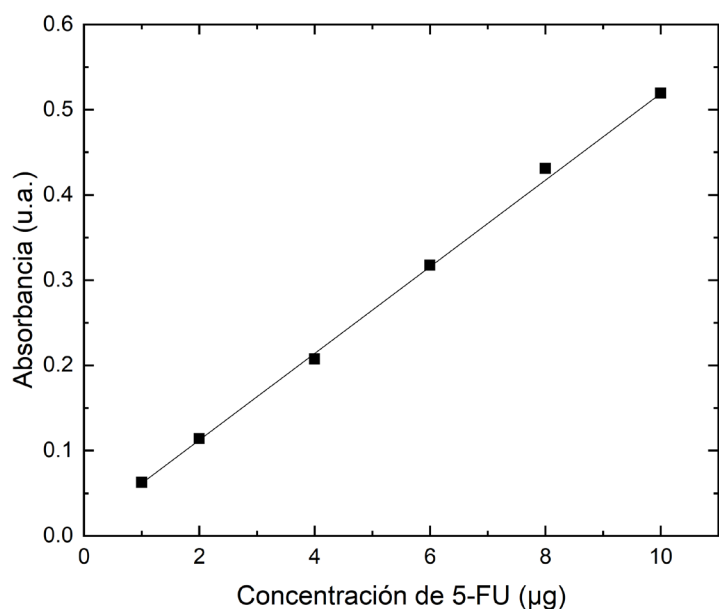


Figura 2.5 Curva de calibración del 5-FU a  $\lambda = 264$  nm.

### 2.6.2. Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* del 5-FU se realizaron siguiendo el método reportado por Sing *et al.* [6], con ligeros cambios. En resumen, los complejos de PAMAM/5-FU se disolvieron en 10 mL de agua bidestilada y se transfirieron a tubos de diálisis. Luego, se colocaron en un tubo de vidrio que contenía 100 mL de PBS como medio de disolución

para el proceso de diálisis (ver Figura 2.6). El medio de disolución se agitó continuamente con un agitador magnético y se recolectaron alícuotas periódicamente (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h) mientras se reemplazaba el mismo volumen del medio de disolución con PBS nuevo. La liberación del fármaco se realizó hasta las 24 h simulando el periodo habitual de administración del 5-fluorouracilo de un día, que es recomendado para el tratamiento del cáncer [43,44]. La cantidad de 5-FU en las muestras extraídas del medio de disolución se estimó usando un espectrofotómetro UV de A&E Lab, a una  $\lambda = 264$  nm en PBS en la región UV, aplicando un procedimiento similar al descrito en la sección 2.6.1. Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron dos veces para cada complejo.

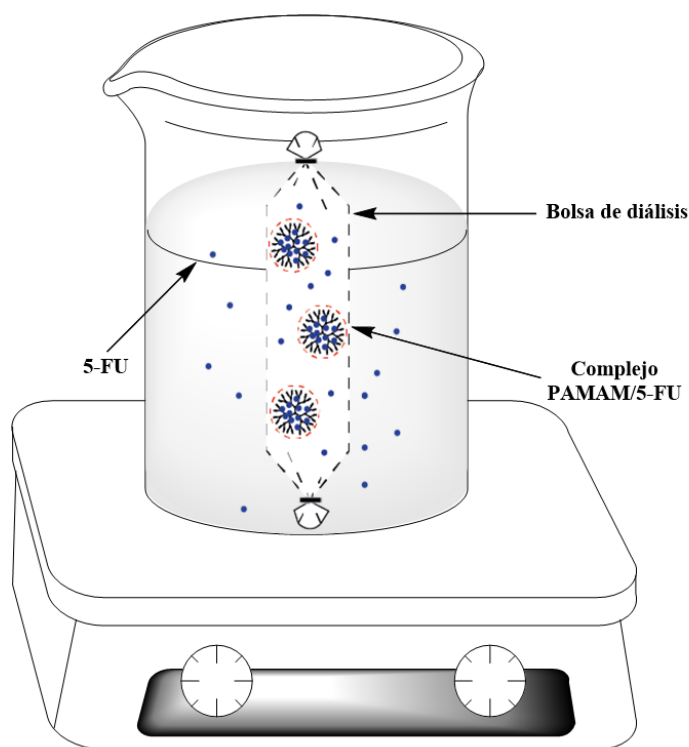


Figura 2.6 Esquema del proceso de diálisis.

### 2.6.3. Modelado de la liberación

Para conocer el mecanismo mediante el cual se libera el 5-fluorouracilo de los dendrímeros de PAMAM, se aplicaron los siguientes modelos cinéticos: orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hixson-Crowell (ver Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Modelos matemáticos utilizados para describir las curvas de liberación del 5-FU

<b>Modelo</b>	<b>Ecuación</b>
Orden cero	$f = k_0t$
Primer orden	$\ln (1-f) = k_1t$
Higuchi	$f = k_Ht^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas	$1 - (1-f)^{1/3} = k_{1/3}t$
Hixson-Crowell	$f = k_{k-p}t^n$

f: fracción de liberación del 5-FU en el tiempo t; k: constante cinética

Los principales parámetros cinéticos, k y n, se calcularon graficando la liberación acumulativa del fármaco frente al tiempo; luego se calcularon n, k y  $r^2$  con una regresión lineal. En todos los modelos, la concentración inicial del fármaco fue cero (es decir  $f_0 = 0$ ).

## 2.7. Recubrimiento de los complejos de PAMAM/5-FU con GG

### 2.7.1. Elaboración de pastillas

El recubrimiento de los complejos de dendrímero/fármaco con goma guar se realizó en dos etapas. En la primera etapa, el fármaco se mezcló con celulosa microcristalina (5 mg/5 mg) con la ayuda de una espátula, luego se colocaron en un pastillador de 6 mm de diámetro y se comprimieron manualmente en una prensa Carver, aplicando una fuerza de 1 T durante 5 min. En la segunda parte, diferentes cantidades de GG (100, 150, 200 y 250 mg) se mezclaron y tamizaron con celulosa microcristalina (10% en peso, en relación al peso de la GG utilizada) para obtener el material de recubrimiento; la CM se incluyó en las formulaciones para impartir suficiente dureza, debido a que las tabletas elaboradas con GG resultaron ser muy suaves. Posteriormente, la mitad del material de recubrimiento se colocó en la cavidad de un pastillador de 13 mm de diámetro, luego las tabletas obtenidas en la primera etapa se colocaron cuidadosamente sobre el material de recubrimiento y se llenaron con la otra mitad del material (ver Figura 2.7). Finalmente, el sistema se comprimió en una prensa, aplicando una fuerza de 3 T durante 5 min [27]. El mismo procedimiento se realizó con los complejos una vez que se determinó que concentración de GG y CM proporcionó los mejores resultados.

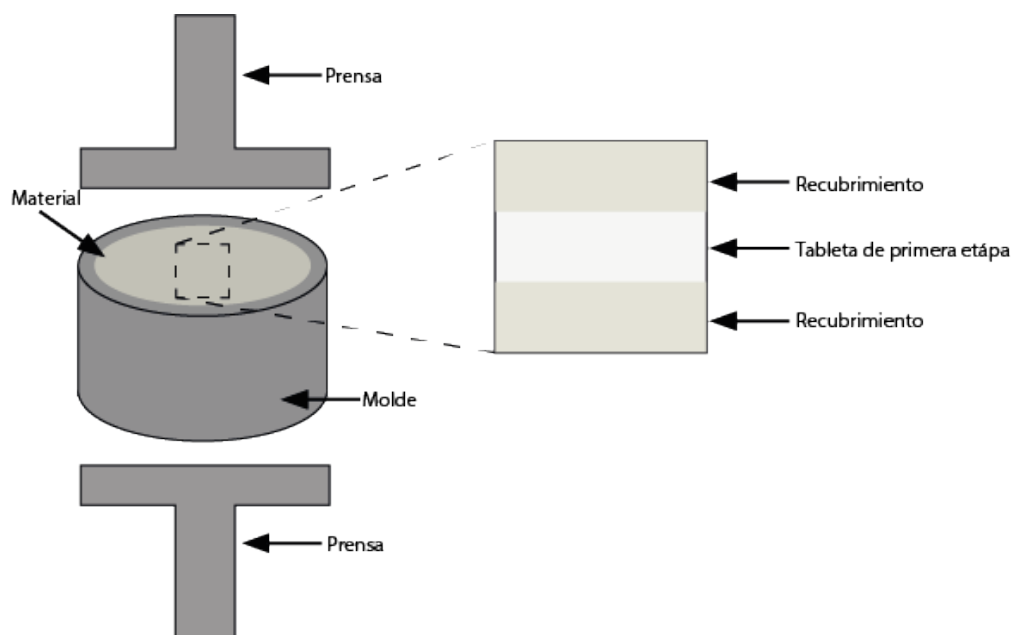


Figura 2.7 Esquema del proceso de recubrimiento.

### 2.7.2. Estudios de liberación *in vitro*

Para evaluar la resistencia del recubrimiento de goma guar, las tabletas se sometieron a estudios de liberación *in vitro* en diferentes medios que simulan el entorno fisiológico del estómago, el intestino delgado y el colon. La metodología, medios fisiológicos y tiempos de reacción se basaron en estudios previos con ligeras modificaciones [16,17,27,28].

Cada tableta se colocó dentro de un contenedor de acero inoxidable y luego se sumergió en vasos de vidrio que contenían 200 mL de los distintos medios fisiológicos, los cuales se agitaron a 37 °C y 100 rpm (Figura 2.8). Para simular el medio estomacal, las muestras se mantuvieron en una solución 0.1 N de HCl durante 2 h, ya que el tiempo de vaciado gástrico es de alrededor de 2 h. Después, el medio de disolución se reemplazó con una solución de PBS 7.4 pH y las muestras se mantuvieron en este sistema durante 3 h, ya que el tiempo de tránsito en el intestino es de aproximadamente 3 h [16,17,27,28].

Por último, las muestras se transfirieron a una solución de PBS 6.7 pH que además contenía la enzima endo-1,4- $\beta$ -mananasa, simulando la acción enzimática producida por las bacterias del colon. Los estudios de liberación *in vitro* en este medio se llevaron a cabo durante 19 h, completando así una digestión de 24 h. También se realizaron estudios sin la

enzima, como medio de control. Al final de cada período de tiempo, se recolectaron alícuotas para determinar el contenido de 5-FU liberado [16,17,27,28].

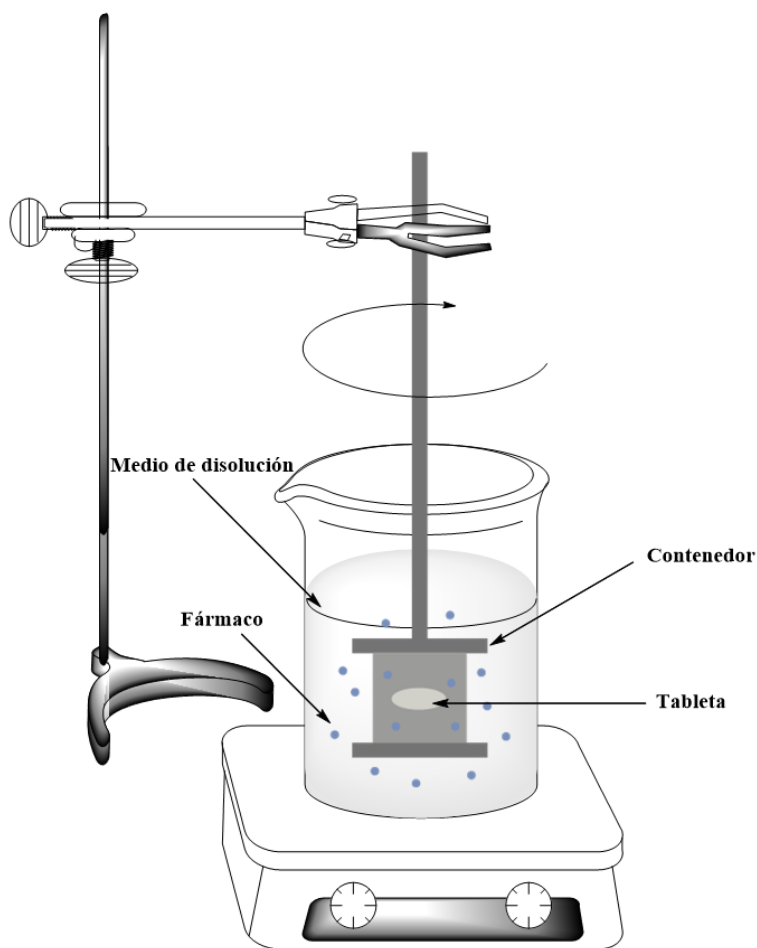


Figura 2.8 Esquema de la liberación *in vitro* del 5-FU a partir de las tabletas recubiertas con GG.

### 2.7.3. Activación de la enzima

Las reacciones enzimáticas fueron realizadas con la endo-1,4- $\beta$ -mananasa del *Cellvibrio japonicus*. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las recomendadas por el proveedor. Primero, se ajustó el pH de PBS a 6.7 con HCl, y la solución se dejó a 37 °C bajo agitación magnética antes de adicionar la enzima. Treinta minutos antes de utilizar este medio de reacción, se adicionó la enzima a una dosis de 1 nkat para su activación (Un katal es definido por el fabricante como la cantidad de enzima requerida para liberar un mol de equivalentes de manosa por segundo del galactomanano).

#### **2.7.4. Determinación de la cantidad de 5-FU liberado**

Para determinar la cantidad del 5-FU liberada en los distintos medios fisiológicos se utilizó un espectrofotómetro UV de A&E Lab. Se prepararon soluciones de cada medio (HCl, PBS 7.4 pH y PBS 6.7 pH) para el 5-FU al 0.1% p/v y luego se registraron los espectros de absorción de UV de 190 a 400 nm para obtener las señales del fármaco. Para la cuantificación del 5-FU, se usó el pico de absorción a  $\lambda = 264$  nm, utilizando un procedimiento similar al descrito en la sección 2.6.1. Dado que la GG y la CM no muestran señales en el UV y los dendrímeros no absorben a esta longitud, la señal observada pertenece únicamente al fármaco.

## CAPÍTULO 3

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización de los dendrímeros de PAMAM

##### 3.1.1. Propiedades generales

Los dendrímeros de PAMAM obtenidos fueron líquidos aceitosos ligeramente amarillos, cuya intensidad de color incrementaba a medida que aumentaba la generación del dendrímero. La morfología de las partículas de los dendrímeros fue en forma esférica, también se observó que se encuentran fuertemente aglomeradas (ver Anexos. Figura A3). La viscosidad de los dendrímeros fue mayor en el caso de los dendrímeros de generación completa en comparación con los dendrímeros de media generación. Los dendrímeros fueron solubles en metanol, etanol, agua y solución búfer de fosfato salino, e insolubles en éter dietílico.

La síntesis exitosa de los dendrímeros se confirmó primero mediante una prueba colorimétrica con una solución acuosa de  $\text{CuSO}_4$  según la metodología reportada por Sing *et al* [6]. En esta prueba, los dendrímeros de generación completa (es decir: 0.0G, 1.0G y 2.0G) exhiben un color púrpura, mientras que los de media generación (es decir: -0.5G, 0.5G y 1.5G) presentan un color azul intenso debido a la formación de complejos entre el ion complejo hexaaquacobre (II)  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  de la solución de sulfato de cobre, con los grupos terminales carboxilo o amina, respectivamente (ver Figura 3.1).

Los rendimientos obtenidos en las generaciones medias -0.5G, 0.5G y 1.5G fueron 97, 95 y 94%, mientras que en las generaciones completas 0.0G, 1.0G y 2.0 G fueron 94, 88 y 82%, respectivamente; el menor porcentaje de rendimiento obtenido en las generaciones completas puede atribuirse a la dificultad de recuperar el dendrímero debido a los diversos pasos en su elaboración (destilación, diálisis, liofilización). El progreso de la síntesis y diferenciación de dendrímeros de media generación y generación completa se confirmó espectrofotométricamente y se discute detalladamente en las siguientes secciones.



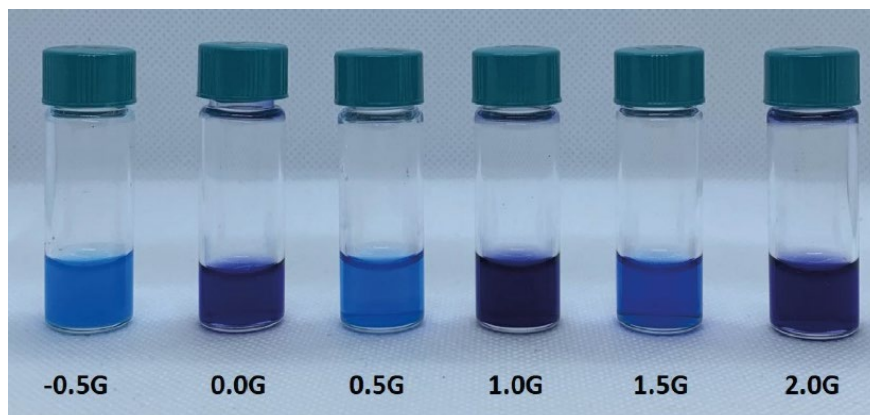


Figura 3.1. Prueba colorimétrica de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G).

### 3.1.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

El análisis de infrarrojo se utilizó para seguir el progreso de la síntesis y el crecimiento del dendrímero hasta la generación 2.0G. Los espectros de FTIR de los monómeros EDA y MA, y de los dendrímeros sintetizados se muestran en la Figura 3.2. Como se puede observar, el espectro de la EDA mostró una banda de absorción a  $3360\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de estiramiento del enlace N-H perteneciente a la amina primaria ( $\text{NH}_2$ ), mientras que el espectro del MA exhibió bandas en  $1724$  y  $1634\text{ cm}^{-1}$  atribuidas a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) y al doble enlace carbono-carbono ( $\text{C}=\text{C}$ ) del grupo vinilo, respectivamente [45–48].

El espectro IR del dendrímero -0.5G mostró bandas de absorción a  $2954$  y  $2825\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones de estiramiento del enlace C-H de los grupos metilo y metileno ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ). La ausencia de la banda ancha en  $3360\text{ cm}^{-1}$  (debido a los grupos  $\text{NH}_2$ ) y de la señal en  $1644\text{ cm}^{-1}$  (debido al doble enlace  $\text{C}=\text{C}$ ), así como el desplazamiento de la banda del  $\text{C}=\text{O}$  de  $1724$  a  $1740\text{ cm}^{-1}$ , confirman la síntesis de esta generación [6,40].

Por otro lado, el espectro del dendrímero 0.0G exhibió bandas superpuestas en  $3400$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones de estiramiento del enlace N-H perteneciente a la amina primaria (NH) de la capa interna del dendrímero y de la amina secundaria ( $\text{NH}_2$ ) de la capa externa, respectivamente. También, se observaron bandas de absorción en el rango de  $2954\text{--}2825\text{ cm}^{-1}$  asociadas con las vibraciones de estiramiento del enlace C-H. Además,

la banda del carbonilo se desplazó de 1740 a 1644  $\text{cm}^{-1}$  debido a la formación de un enlace amida, lo que confirma la síntesis del dendrímico 0.0G [6,40].

La presencia de bandas de carbonilo en 1740  $\text{cm}^{-1}$  (debido al enlace éster) y en 1644  $\text{cm}^{-1}$  (debido al enlace amida) alternativamente a medida que aumenta la generación del dendrímico sintetizado (es decir: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0G), no sólo confirma la síntesis exitosa de los dendrímicos, sino que también demuestra el crecimiento de esta estructura. Este fenómeno de desplazamiento en el número de onda se debe a los efectos inductivos y de resonancia de los grupos carbonilos (éster o amida) [6,40].

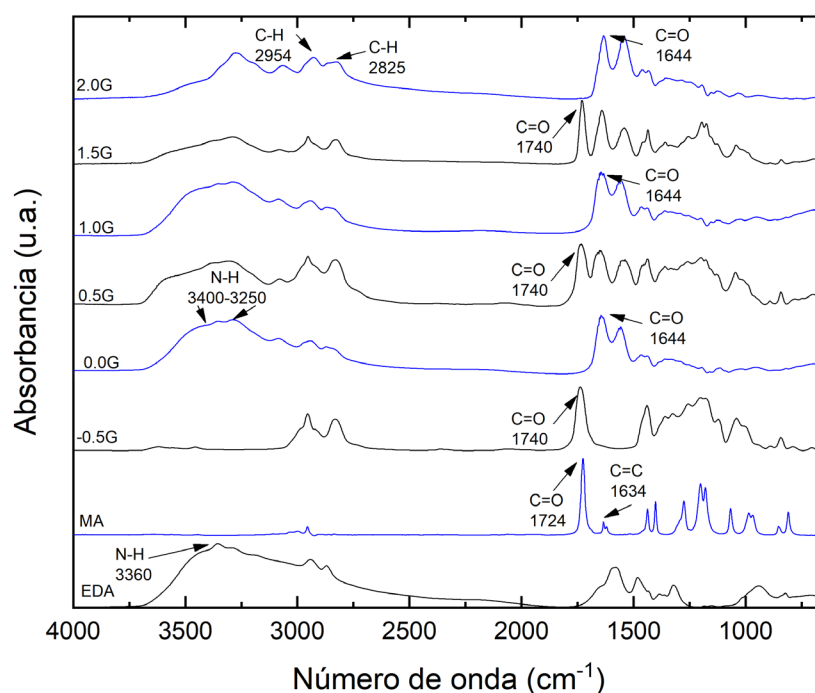


Figura 3.2. Espectros de FTIR de los monómeros (EDA y MA) y de los dendrímicos de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G).

### 3.1.3. Espectroscopia de ultravioleta visible

La espectroscopia de ultravioleta visible se utilizó como herramienta complementaria para respaldar los cambios observados en el análisis FTIR. La Figura 3.3 muestra los espectros de UV-vis de los monómeros y de los dendrímicos sintetizados. Así, los espectros de los monómeros presentaron una sola banda de absorción, la cual se ubicó a 212 nm para la EDA y a 240 nm para el MA; en contraste, los espectros de UV-vis de los dendrímicos de PAMAM mostraron dos bandas de absorción. La primera banda se encuentra a 230 nm y se

mantiene constante a medida que aumenta la generación del dendrímero. Por el contrario, la segunda banda se desplaza desde una longitud de onda alta a una más baja, a medida que aumenta la generación del dendrímero. Este hecho también proporciona evidencia de la síntesis de los dendrímeros de PAMAM.

Estas bandas surgen de las transiciones electrónicas de los grupos cromóforos y son altamente absorbentes. Según Skoog *et al.* [49] la primera banda observada en los dendrímeros de PAMAM y en el monómero de EDA se atribuye al cromóforo amina, mientras que la segunda banda en los dendrímeros y en el monómero de MA deriva de la transición  $n \rightarrow \pi^*$  debido al cromóforo carbonilo [49–52]. También se encontró que la segunda transición obtenida para los dendrímeros de media generación (-0.5G, 0.5G y 1.5G) presenta un valor constante ( $\lambda = 282$  nm), mientras que los derivados de generaciones completas tienden a disminuir a medida que se incrementa la generación de 280 nm para la generación 0.0G a 276 nm para la generación 2.0G.

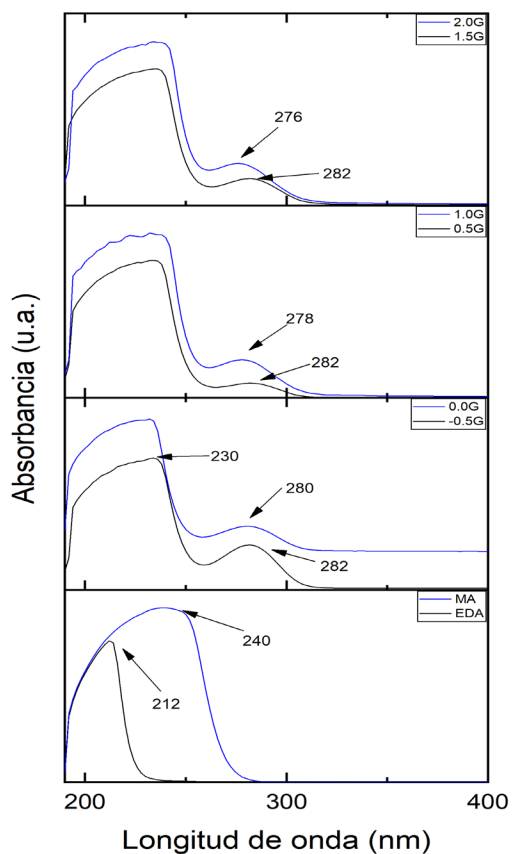


Figura 3.3. Espectros de UV-vis de los monómeros (EDA y MA) y de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G).

### 3.1.4. Resonancia magnética nuclear de protón

Los cambios en la estructura química de los dendrímeros después de cada paso de polimerización se estudiaron mediante resonancia magnética nuclear de protón. Los espectros de RMN-1H de los monómeros y de los dendrímeros sintetizados se muestran en la Figura 3.4. Como se observa, el espectro de la EDA mostró una única señal a 2.37 ppm atribuida a los protones de metileno (-CH<sub>2</sub>-). Interesantemente, no se observaron protones unidos al átomo de nitrógeno debido, probablemente, a la velocidad de intercambio de los protones de la amina con el deuterio del CDCl<sub>3</sub>. Los hidrógenos pertenecientes al grupo vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>) del MA presentaron tres picos a 6.30, 6.05 y 5.73 ppm, atribuidos a los protones en las posiciones *cis*, *gem* y *trans* respectivamente. La señal observada en 3.67 ppm se asignó a los protones de metoxilo (-O-CH<sub>3</sub>) del acrilato. Por otro parte, la síntesis de los dendrímeros de PAMAM fue confirmada por la presencia de los protones de metilo terminales (-COOCH<sub>3</sub>) a 3.63 ppm en los dendrímeros de media generación, y por la ausencia de esta señal en este desplazamiento químico en los dendrímeros generación completa [6,40].

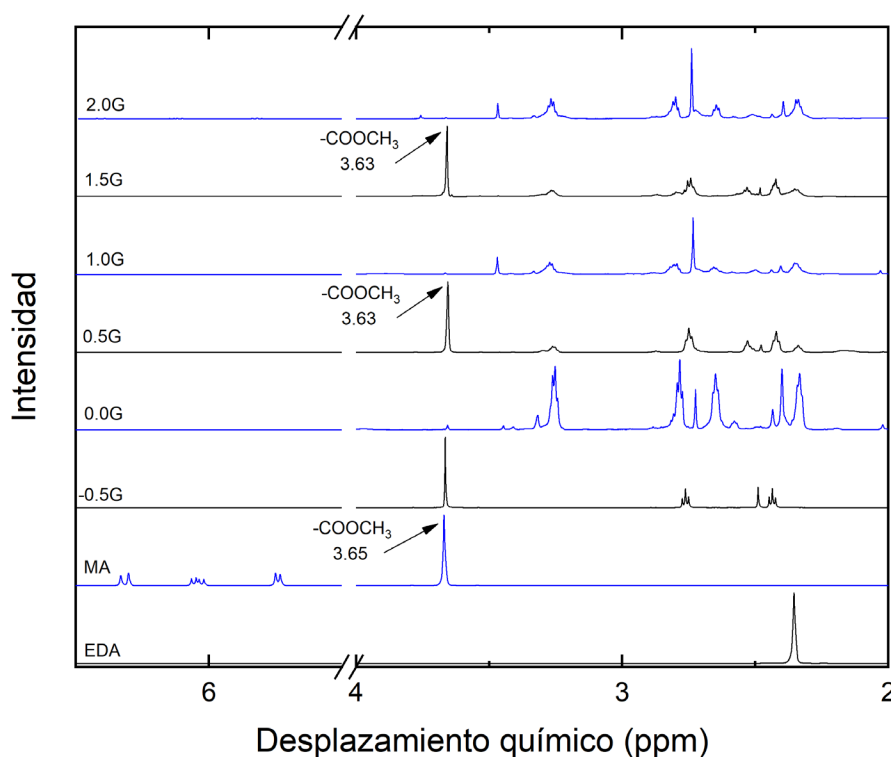


Figura 3.4. Espectros RMN-1H de los monómeros (EDA y MA) y de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G).

### 3.1.5. Dispersión de luz dinámica

Se realizaron mediciones de DLS para determinar y comparar los tamaños de los diferentes dendrímeros sintetizados. Las mediciones obtenidas se resumen en la Tabla 3.1. Se determinó que el tamaño de los dendrímeros se encuentra en el rango de los nanómetros. Los resultados de DLS mostraron un aumento en el tamaño del diámetro promedio a medida que aumentan los dendrímeros del mismo tipo de generación ( $-0.5G < 0.5G < 1.5G$  y  $0.0G < 1.0G < 2.0G$ ), y a medida que los dendrímeros de media generación se modifican para producir una generación completa ( $-0.5G < 0.0G$ ,  $0.5G < 1.0G$ ,  $1.5G < 2.0G$ ).

La variación del diámetro hidrodinámico ( $d$ ) observada en los dendrímeros de media generación fue de 1.34 a 1.60 nm, mientras que en los dendrímeros de generación completa fue de 1.67 a 1.87 nm, probablemente debido a la nueva capa del dendrímero generada con la siguiente generación. A pesar de esto, no se observó una variación del diámetro secuencialmente (es decir:  $-0.5G$ ,  $0.0G$ ,  $0.5G$ , etc.) debido al tipo de grupo terminal en la capa exterior (carboxilo o amina). Algunos estudios informaron diámetros de  $3.0 \pm 0.7$  nm [53] y de  $4.0 \pm 1$  nm [54] para dendrímeros comerciales de PAMAM de generación 4.0 disueltos en agua. Por lo tanto, los valores de los diámetros obtenidos en este trabajo se encuentran en el rango de los reportados por otros autores.

Tabla 3.1 Diámetros de los dendrímeros de PAMAM ( $-0.5G$ ,  $0.0G$ ,  $0.5G$ ,  $1.0G$ ,  $1.5G$  y  $2.0G$ ).

Dendrímero	d (nm)
$-0.5G$	$1.34 \pm 0.17$
$0.0G$	$1.67 \pm 0.04$
$0.5G$	$1.40 \pm 0.10$
$1.0G$	$1.65 \pm 0.04$
$1.5G$	$1.60 \pm 0.13$
$2.0G$	$1.87 \pm 0.08$

### 3.1.6. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se empleó para estudiar la estabilidad térmica de los dendrímeros. Las curvas de pérdida de masa (TGA) y de la primera derivada (DTGA) de los dendrímeros sintetizados se presentan en la Figura 3.5. Así, en la Figura 3.5a, se observa que todos los dendrímeros de PAMAM tienen una pérdida de masa superior al 90%. A partir de las curvas de la primera derivada (Figura 3.5b) se puede observar que la degradación térmica de los dendrímeros de media generación (-0.5G, 0.5G y 1.5G) se produce en un solo paso, mientras que los pertenecientes a la generación completa (0.0G, 1.0G y 2.0G) ocurre en dos pasos de descomposición.

Las temperaturas de descomposición observadas en los dendrímeros de media generación se encuentran alrededor de 222-256 °C y esto puede atribuirse a las escisiones del enlace éster presente en las capas externas del dendrímero. Por otro lado, las temperaturas de descomposición de los dendrímeros de generación completa están en el rango de 283-300 °C y 338-365 °C, y probablemente son causadas por las escisiones del enlace amida.

Interesantemente, las curvas DTGA también muestran que la Td de los dendrímeros de media generación se desplazó de 256 a 222 °C debido a las escisiones de los enlaces éster a medida que aumenta la generación del dendrímero. Por el contrario, las dos temperaturas de degradación de los dendrímeros de generación completa se desplazaron a temperaturas más altas a medida que aumenta la generación del dendrímero, debido a la alta estabilidad térmica del enlace amida.

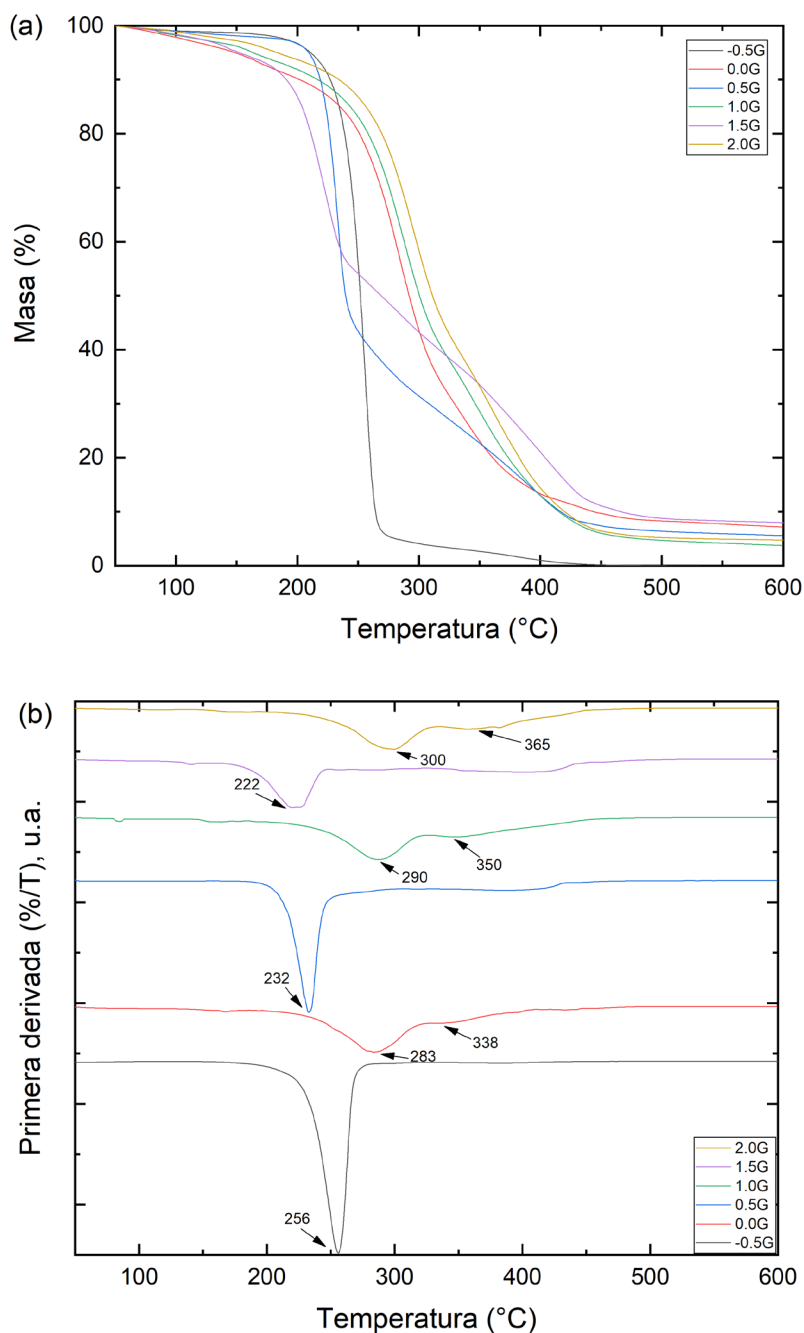


Figura 3.5. Curvas de (a) TGA y (b) DTGA de los dendrímeros de PAMAM (-0.5G, 0.0G, 0.5G, 1.0G, 1.5G y 2.0G).

### 3.2. Caracterización del 5-FU

Los espectros de FTIR y UV-vis, así como las curvas de TGA/DTGA y la imagen de SEM del 5-FU se muestran en la Figura 3.6. En el espectro FTIR (Figura 3.6a) se observan las bandas de absorción características del 5-FU en 3136, 1660, 1450, 1430 y 1246  $\text{cm}^{-1}$

atribuidas a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H, C=O, C=C, C-F y C-N, respectivamente [55–57]. El espectro de UV-vis (Figura 3.6b) reveló dos picos de absorción, localizados a 208 y 264 nm; la primera banda de absorción probablemente corresponde a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del doble enlace C=C, mientras que el segundo pico puede atribuirse a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  perteneciente al grupo carbonilo [6,49,52]. En el termograma de la Figura 3.6c se observa que el fármaco es térmicamente estable hasta los 200 °C. La morfología del 5-FU es en forma de pellets fuertemente aglomerados debido a las fuertes interacciones que se producen entre las partículas del fármaco.

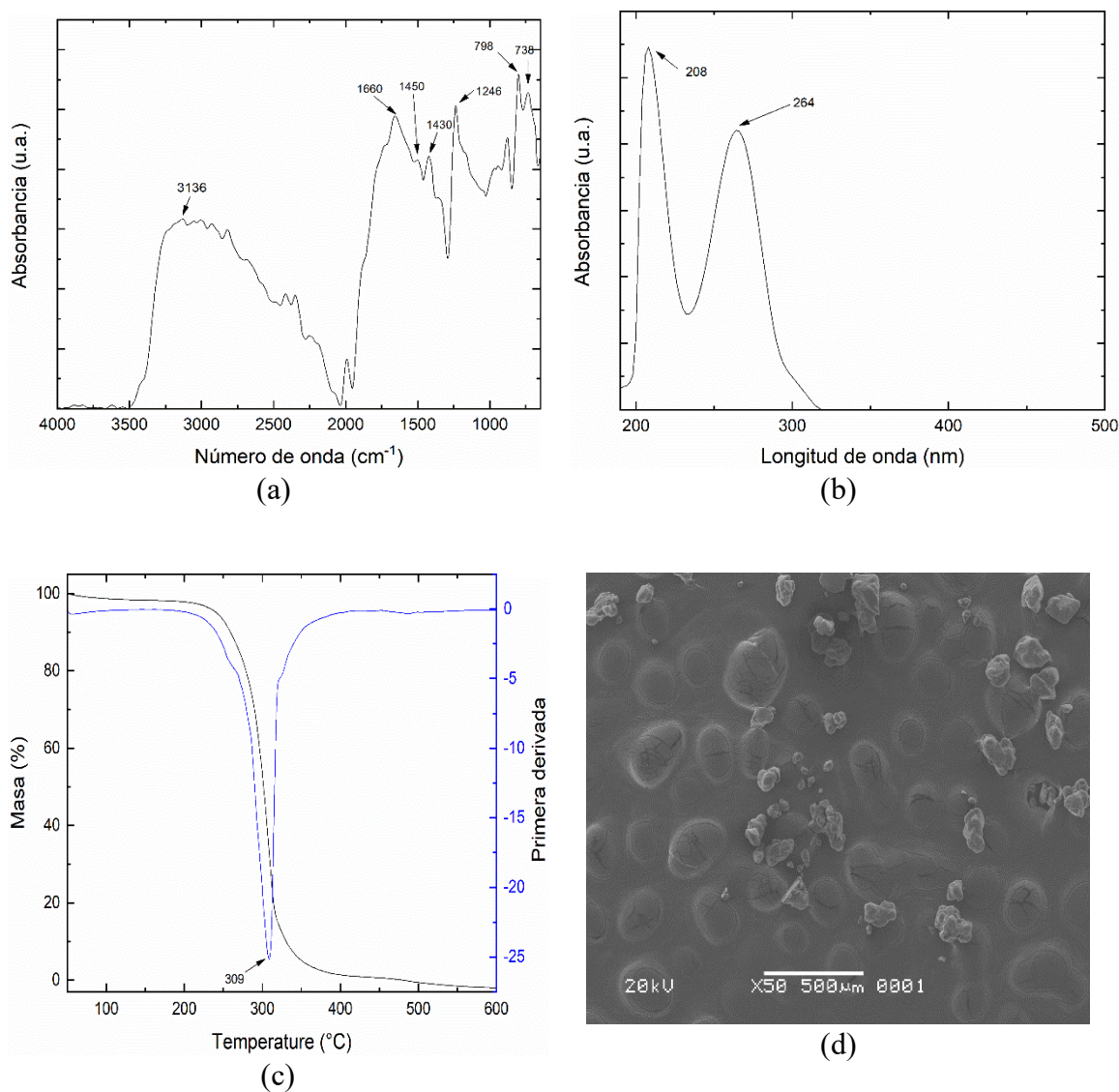


Figura 3.6 (a) espectro de FTIR, (b) espectro de UV-vis, (c) curvas TGA/DTGA y (d) micrografía SEM del 5-FU.



### **3.3. Caracterización de los complejos de PAMAM/5-FU**

#### **3.3.1. Propiedades**

Los complejos de PAMAM/5-FU obtenidos fueron polvos de color blanco a diferencia de los dendrímeros de PAMAM que eran líquidos aceitosos. Este cambio en la apariencia de los productos sugiere que se produjo la formación de complejos entre los dendrímeros y el 5-fluorouracilo. Los complejos de PAMAM/5-FU fueron solubles en metanol, etanol, agua y solución buffer de fosfato salino.

#### **3.3.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier**

La espectroscopia IR se utilizó para estudiar las interacciones del 5-fluorouracilo con los diferentes dendrímeros de PAMAM. Los espectros FTIR de los dendrímeros y sus correspondientes complejos se presentan en la Figura 3.7. Se observó que los espectros de los complejos fueron muy similares a los obtenidos por los dendrímeros, aunque se observaron algunas diferencias; por ejemplo, el cambio de algunas bandas de absorción indica la presencia de interacciones entre los dendrímeros y el 5-fluorouracilo. Los cambios más notables ocurrieron en la región de 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$  donde las bandas de absorción atribuidas a la vibración N-H de los grupos de amina de los dendrímeros se desplazaron a números de onda más bajos (3260-3253  $\text{cm}^{-1}$ ) una vez que se formaron los complejos. Un comportamiento similar se observó en la banda del carbonilo de los dendrímeros, que se desplazó ligeramente (1740  $\text{cm}^{-1}$  en medias generaciones y 1644  $\text{cm}^{-1}$  en generaciones completas) a longitudes de onda más bajas (1645-1628  $\text{cm}^{-1}$ ) en los complejos PAMAM/5-FU. Los desplazamientos de estas bandas se deben a la formación de interacciones, probablemente, puentes de hidrógeno entre los dendrímeros y el 5-FU, lo que confirma la complejación [8,25]. En la Figura 3.8 se muestra una representación esquemática de los sitios potenciales para la formación de puentes de hidrógeno. Además, los espectros de FTIR de los complejos muestran dos bandas débiles a 798 y 738  $\text{cm}^{-1}$  que no estaban presentes en los espectros de los dendrímeros; estas bandas se atribuyen a la banda de flexión C-H fuera del plano del anillo aromático del 5-FU y confirman la presencia del fármaco en los dendrímeros [55,57].

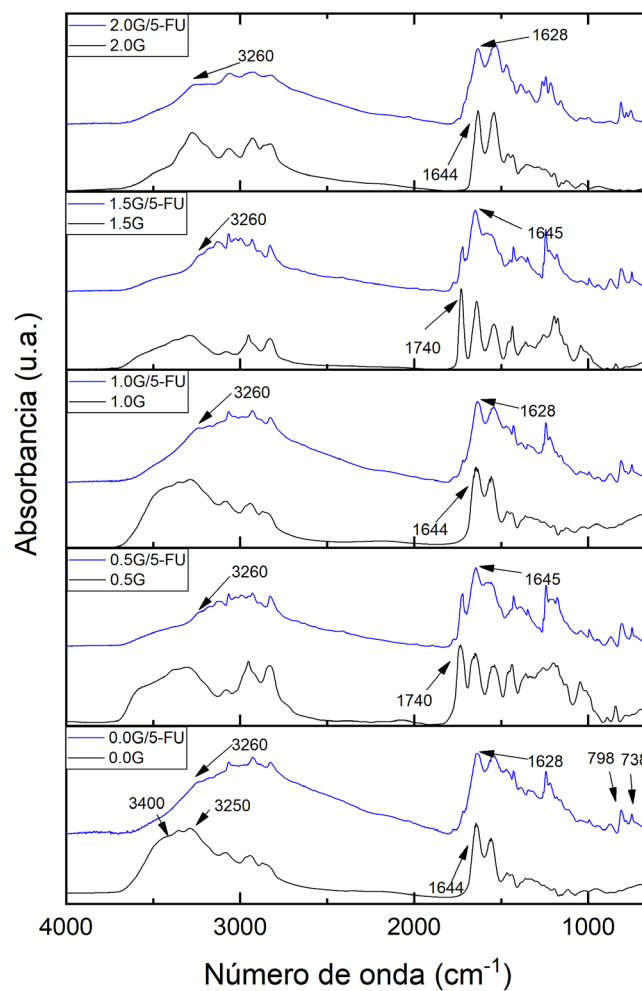


Figura 3.7. Espectros FTIR de los dendrímeros de PAMAM y de los complejos de PAMAM/5-FU.

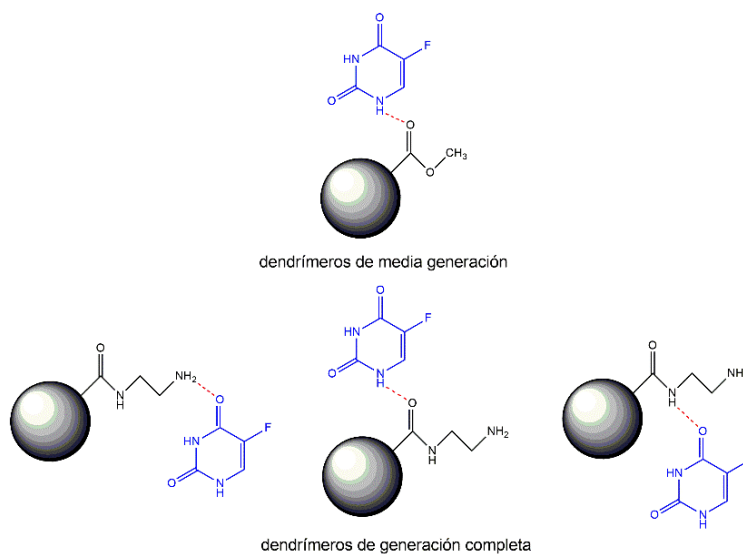


Figura 3.8. Representación esquemática de los puentes de hidrógeno entre los dendrímeros (generación media y completa) y el 5-FU.

### 3.3.3. Espectroscopia de ultravioleta visible

Se realizó el análisis de ultravioleta visible para estudiar los cambios en los dendrímeros tras la formación de los complejos con el 5-FU. Los espectros UV-vis de los dendrímeros de PAMAM y sus respectivos complejos se muestran en la Figura 3.9. En general, los espectros de los complejos muestran diferencias con los obtenidos para sus correspondientes dendrímeros. Así, las dos bandas de absorción que aparecían a 230 nm y alrededor de 280 nm en los dendrímeros ahora son reemplazadas por una sola señal ancha centrada cerca de los 248 nm [49,52,58]. Este hecho podría atribuirse a que el espectro UV-vis del 5-FU también muestra señales en esta región que generan un traslape de bandas en el intervalo de longitud de onda de 190-300 nm. Este resultado evidencia las fuertes interacciones que se forman entre los dendrímeros y el 5-fluorouracilo después del proceso de complejación.

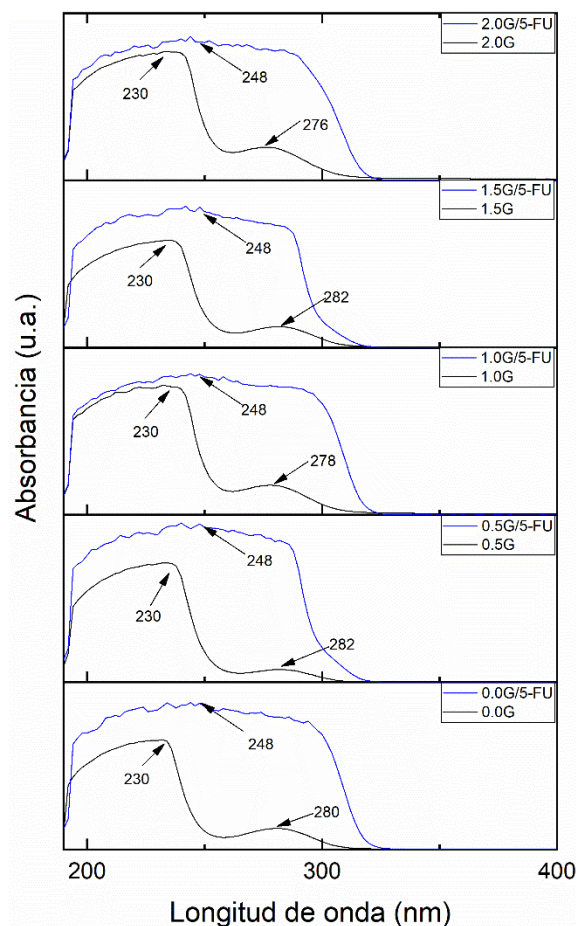


Figura 3.9. Espectros UV-vis de los dendrímeros de PAMAM y de los complejos de PAMAM/5-FU.

### 3.3.4. Análisis termogravimétrico

La estabilidad térmica de los dendrímeros de PAMAM y de los complejos de dendrímero/fármaco se estudió mediante análisis termogravimétrico. La Figura 3.10 muestra las curvas TGA de los dendrímeros y de sus respectivos complejos. Se observó que el comportamiento de descomposición térmica de los dendrímeros se modifica al estar formando complejos con el fármaco 5-FU. Los complejos de PAMAM/5-FU se descomponen continuamente (monótonamente) mientras que los dendrímeros se descomponen en etapas definidas. Interesantemente, la masa residual de los complejos de PAMAM/5-FU observada a 600 °C fue de aproximadamente 30%, mientras que en el caso de los dendrímeros de PAMAM fue de 5-8% y de 0% para el 5-FU, lo que demuestra el aumento de la estabilidad térmica de los dendrímeros debido a la formación de

interacciones con el fármaco [8,25]. Estos resultados también confirman la formación de los complejos.

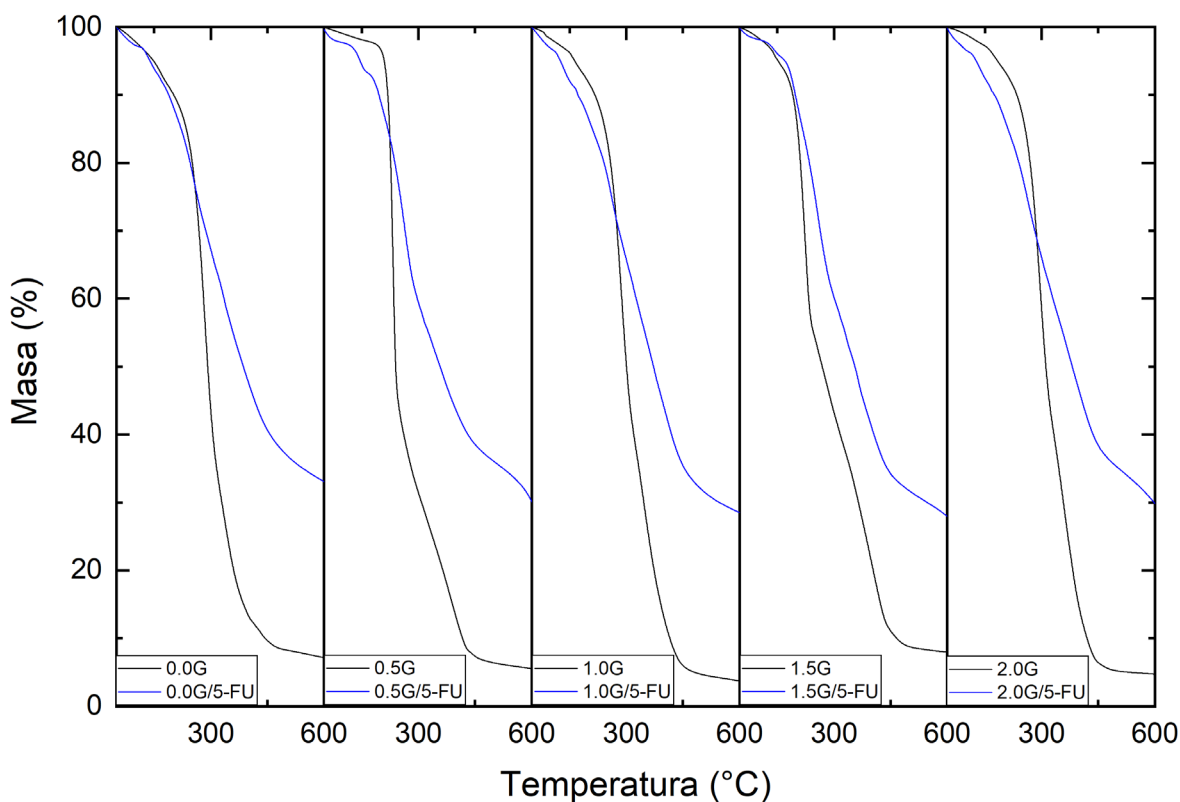
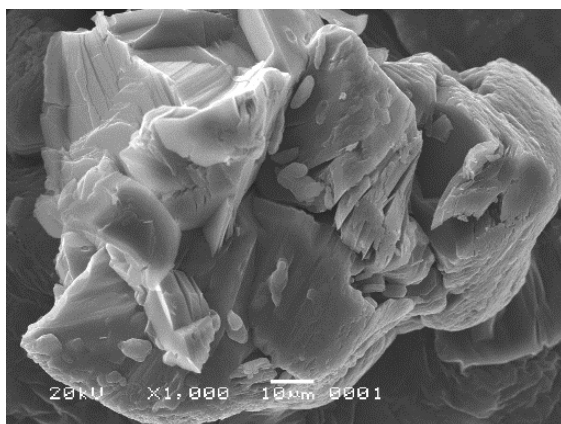


Figura 3.10. Curvas de TGA de los dendrímeros de PAMAM y los complejos de PAMAM/5-FU.

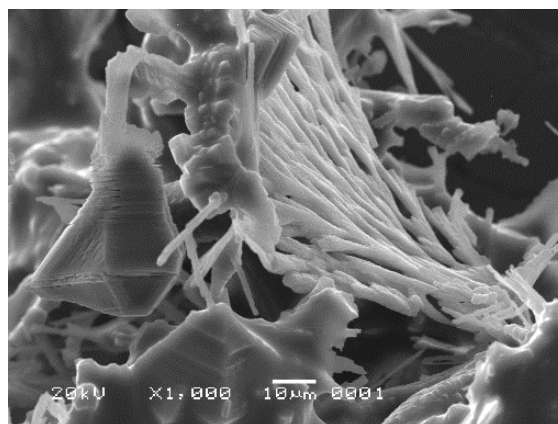
### 3.3.5. Microscopía Electrónica de Barrido

La Figura 3.11 muestra las imágenes de SEM de los complejos de PAMAM/5-FU. En general, la morfología de los complejos se puede describir como gránulos que forman agregados de forma irregular. Las micrografías también muestran que el 5-FU se encuentra incrustado en los dendrímeros. Debido a la pérdida de agua por la liofilización y a la tendencia a la aglomeración, tanto por el fármaco como por los dendrímeros, las partículas de los complejos se muestran compactadas. Un comportamiento similar se observó en la micrografía de TEM del complejo 0.0G/5-FU (Figura 3.12) donde se observó que las partículas del 5-FU están fuertemente aglomeradas con el dendrímero. Es importante recalcar que el 5-FU tiene varios sitios potenciales (grupos carboxilo y amina) para formar

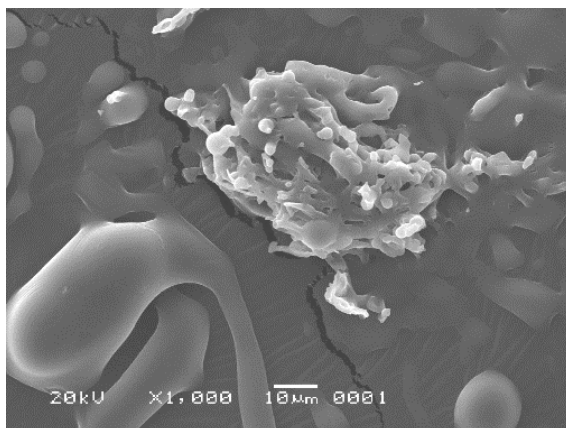
interacciones con los dendrímeros de PAMAM, como se ha mencionado anteriormente, lo cual genera la formación de aglomerados.



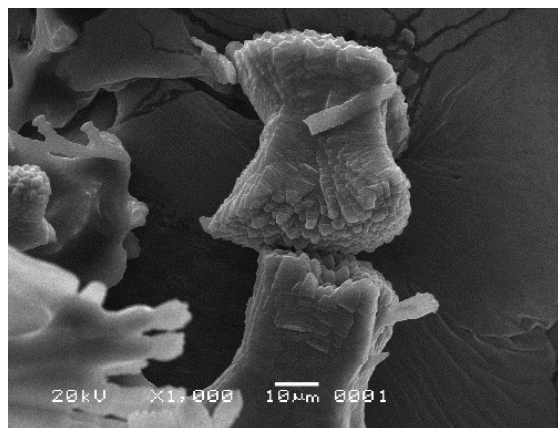
0.0G/5-FU



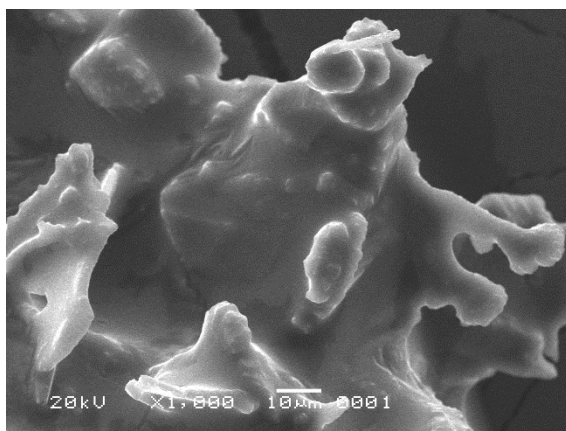
0.5G/5-FU



1.0G/5-FU



1.5G/5-FU



2.0G/5-FU

Figura 3.11. Microscopias de SEM de los complejos de PAMAM/5-FU.

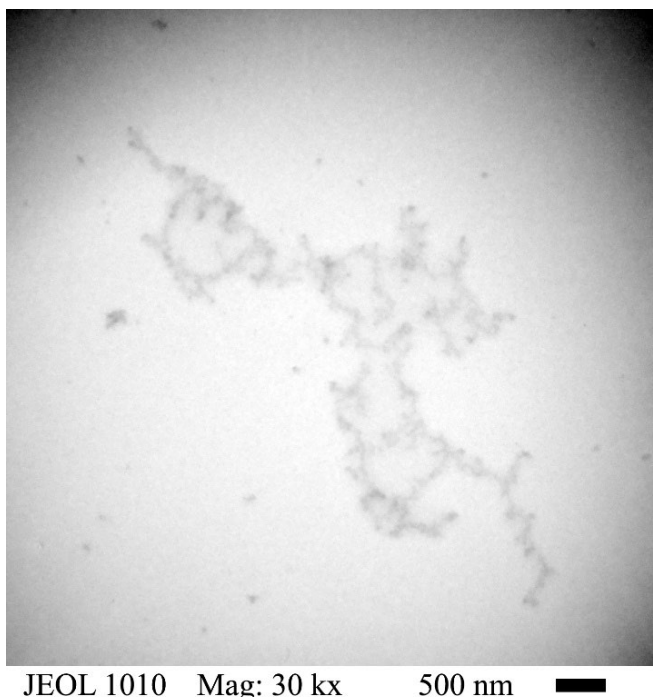


Figura 3.12. Microscopia de TEM del complejo PAMAM/5-FU (0.0G/5-FU).

### 3.3.6. Microanálisis por dispersión de energía de rayos X

Para detectar y cuantificar el flúor en los complejos se realizaron estudios de EDX. Los resultados de los complejos de PAMAM/5-FU obtenidos se resumen en la Tabla 3.2. Como puede verse, los nanoacarreadores están compuestos principalmente por carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O) y flúor (F); la existencia de este último elemento confirma la presencia del 5-FU en todos los complejos. Interesantemente, el contenido de F parece disminuir a medida que aumenta la generación del dendrímero. Esto podría explicarse si se considera que la cantidad de flúor permaneció constante en los complejos (debido a que se utiliza 5 mg de 5-FU en todas las formulaciones) mientras que la masa del dendrímero incrementa a medida que aumenta la generación de dendrímero. Por otro lado, la Figura 3.13 muestra el mapeo de los elementos presentes en el complejo de PAMAM/5-FU (0.0G/5-FU). En las imágenes se observa que el flúor se distribuye uniformemente sobre el dendrímero, lo cual demuestra la presencia del 5-FU. Por otro lado, el nitrógeno no fue observado en el mapeo debido a la sensibilidad del equipo.

Tabla 3.2 Composición elemental de EDX de los complejos de PAMAM/5-FU.

Elemento	Complejos de PAMAM/5-FU (% en masa)				
	0.0G/5-FU	0.5G/5-FU	1.0G/5-FU	1.5G/5FU	2.0G/5-FU
C	36.73 ± 1.22	47.25 ± 3.38	42.40 ± 2.70	44.07 ± 1.97	37.05 ± 2.14
N	30.02 ± 1.75	22.86 ± 0.81	32.28 ± 2.67	23.93 ± 1.69	32.88 ± 2.69
O	24.97 ± 1.56	24.90 ± 1.71	20.54 ± 2.23	26.71 ± 2.09	24.78 ± 2.67
F	8.29 ± 2.44	5.00 ± 1.92	4.79 ± 0.97	5.29 ± 1.19	4.61 ± 1.80

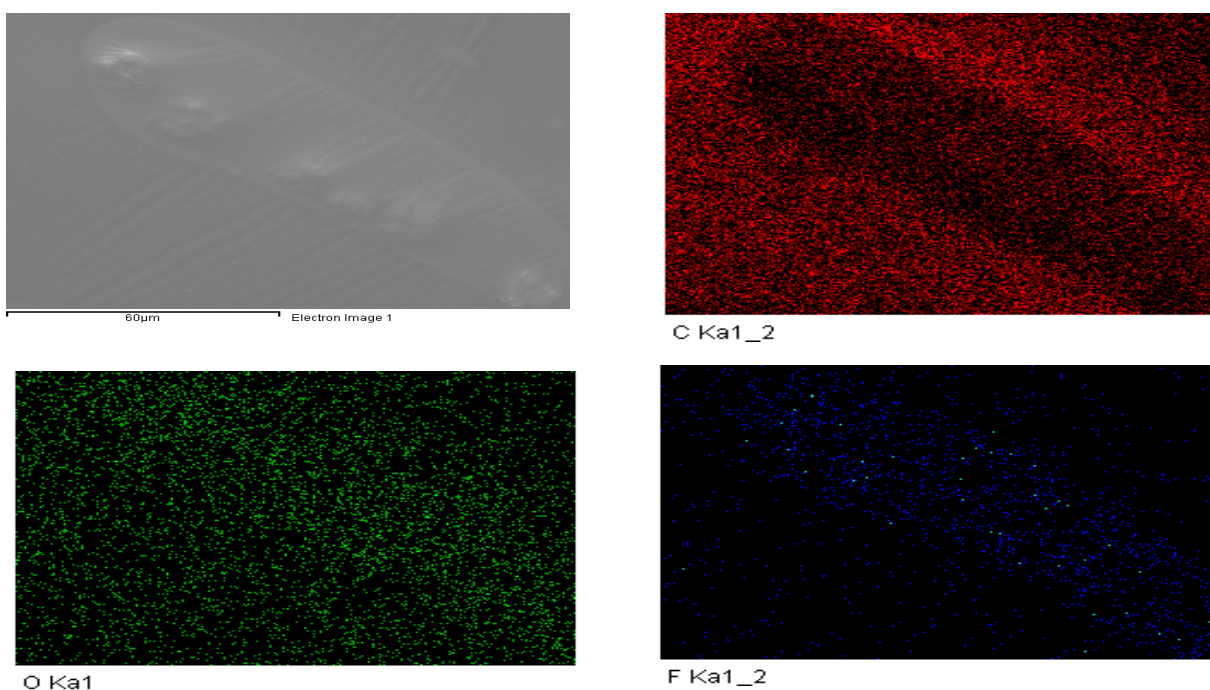


Figura 3.13. Mapeo EDS del complejo PAMAM/5-FU (0.0G/5-FU).

### 3.4. Estudios de liberación

#### 3.4.1. Eficiencia de encapsulación

La cantidad de 5-FU cargada en los diferentes dendrímeros se resume en la Tabla 3.3. En general, todos los complejos mostraron una alta capacidad de carga de fármaco. Los datos muestran que hay menos carga de fármaco dentro de los dendrímeros de media generación (0.5G y 1.5G) en comparación con los dendrímeros de generación completa (0.0G, 1.0G y 2.0G).



Como se mostró en la Figura 3.8, los dendrímeros de media generación tienen un solo sitio en cada ramificación donde pueden formar puentes de hidrógeno con el 5-FU, mientras que los dendrímeros de generación completa contienen múltiples sitios para formar puentes de hidrógeno con el fármaco, lo que puede favorecer a una capacidad de carga más alta; sin embargo, estos sitios no pueden ocuparse simultáneamente debido al impedimento estérico.

Los resultados también sugieren que los dendrímeros de generación completa encapsularon la misma cantidad de 5-FU (~ 94%) que los dendrímeros de media generación (~ 90%). Esto indica que la eficiencia de encapsulación no está en función del tamaño del dendrímero, sino en función del tipo de generación (es decir: media generación o generación completa).

Tabla 3.3 Eficiencia de encapsulación de los complejos de PAMAM/5-FU.

<b>Complejos de PAMAM/5-FU</b>	<b>Eficiencia de encapsulación (%)</b>
0.0G/5-FU	94.35 ± 1.20
0.5G/5-FU	90.04 ± 0.74
1.0G/5-FU	94.64 ± 0.37
1.5G/5-FU	89.63 ± 1.15
2.0G/5-FU	95.55 ± 0.41

### **3.4.2. Liberación *in vitro* del 5-FU de los dendrímeros de generación completa**

La liberación *in vitro* del 5-FU a partir de los dendrímeros de generación completa (0.0G, 1.0G y 2.0G) se muestra en la Figura 3.14. Como se puede observar, los perfiles mostraron que la liberación del fármaco a partir de estos dendrímeros es más lenta que la obtenida por la muestra control. Este perfil de liberación podría deberse a la formación de múltiples interacciones (como se observa en FTIR, Figura 3.7), probablemente por puentes de hidrógeno, entre los grupos carbonilo y amina pertenecientes al fármaco y a los dendrímeros (ver Figura 8).

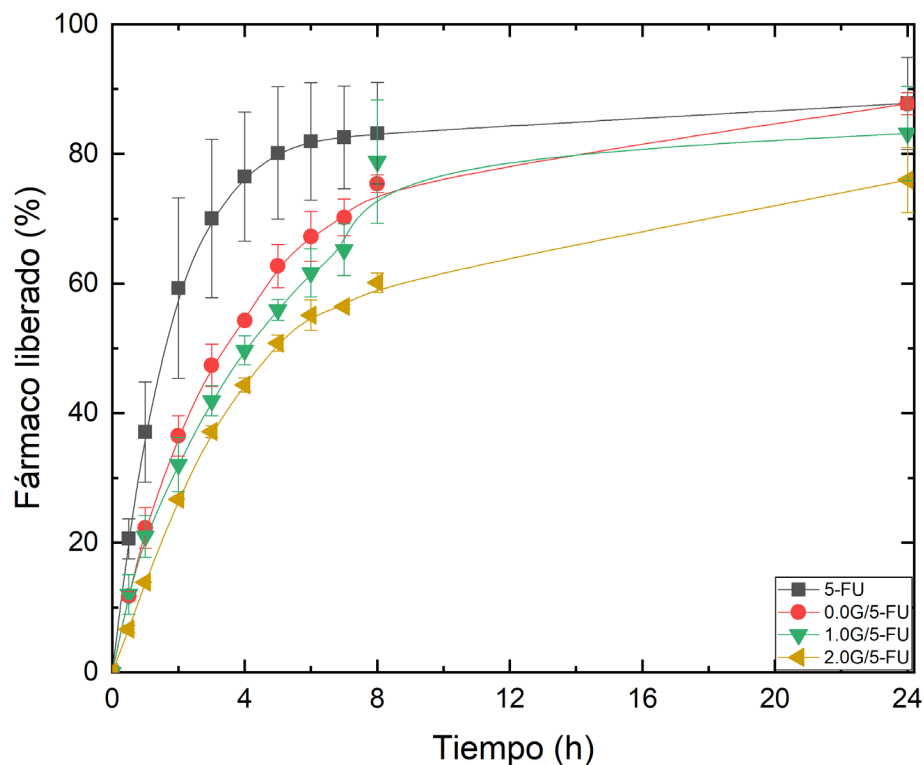


Figura 3.14. Perfiles de liberación *in vitro* del 5-FU de los dendrímeros de generación completa.

### 3.4.3. Liberación *in vitro* del 5-FU de los dendrímeros de media generación

La Figura 3.15 muestra los perfiles de liberación del 5-FU de los dendrímeros de media generación (0.5G y 1.5G). Se encontró que la liberación del fármaco a partir de estos dendrímeros es similar a la obtenida por el control, el cual se caracteriza por una velocidad de liberación rápida. Este resultado puede deberse a las pocas interacciones (puentes de hidrógeno) entre el fármaco y los dendrímeros de PAMAM de medias generaciones. Como se mostró en la Figura 3.8, los dendrímeros de media generación tienen un solo sitio (en cada ramificación) para formar puentes de hidrógeno con el 5-FU. Por tanto, es más difícil retener el fármaco en este tipo de dendrímero.

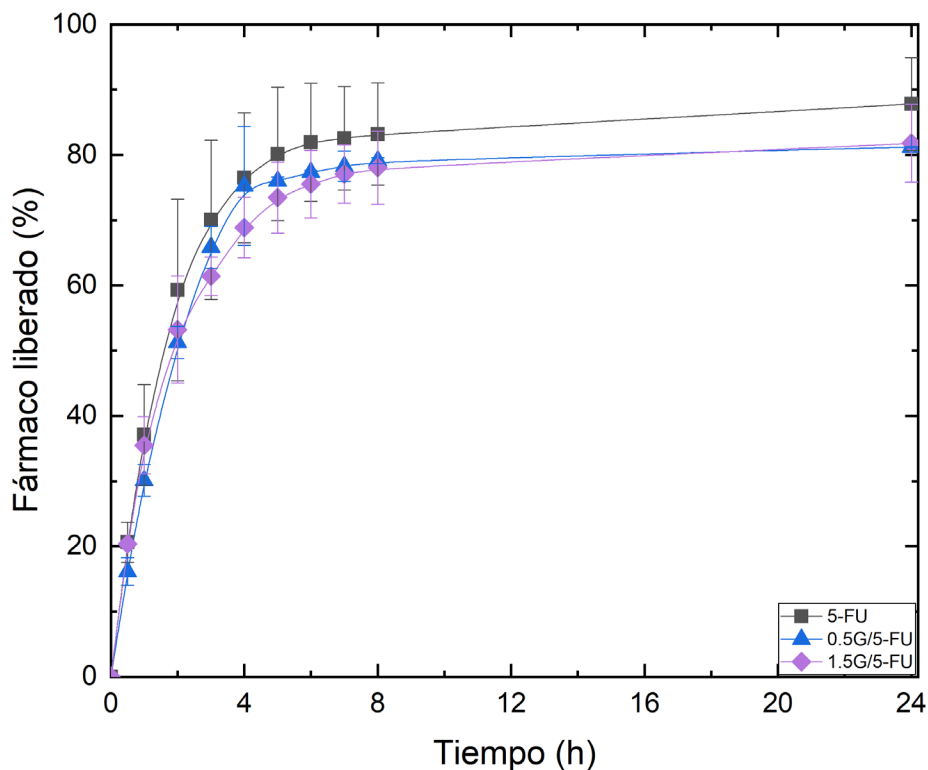


Figura 3.15. Perfiles de liberación *in vitro* del 5-FU de los dendrímeros de media generación.

#### 3.4.4. Comparación entre complejos de dendrímeros de media generación y generación completa

Se observó en la Figura 3.16 que para los dendrímeros de media generación, la liberación del 5-FU fue más rápida que para los dendrímeros de generación completa. La liberación lenta de 5-fluorouracilo de los complejos 0.0G/5-FU, 1.0G/5FU y 2.0G/5-FU podría deberse a las interacciones más fuertes del fármaco con los grupos exteriores (carbonilo y amina) de los dendrímeros de PAMAM. Por lo tanto, podría sugerirse que la fuerza y el número de interacciones electrostáticas determinan el comportamiento de liberación del fármaco a partir de los dendrímeros, las cuales son más fuertes en los dendrímeros de generación completa. El estudio también reveló que el complejo 2.0G/5-FU liberó la menor cantidad de fármaco durante el tiempo de prueba; esto se debe a que el dendrímero 2.0G tiene un alto número de grupos funcionales, en comparación con los otros dendrímeros, lo que permite más interacciones con el 5-FU.

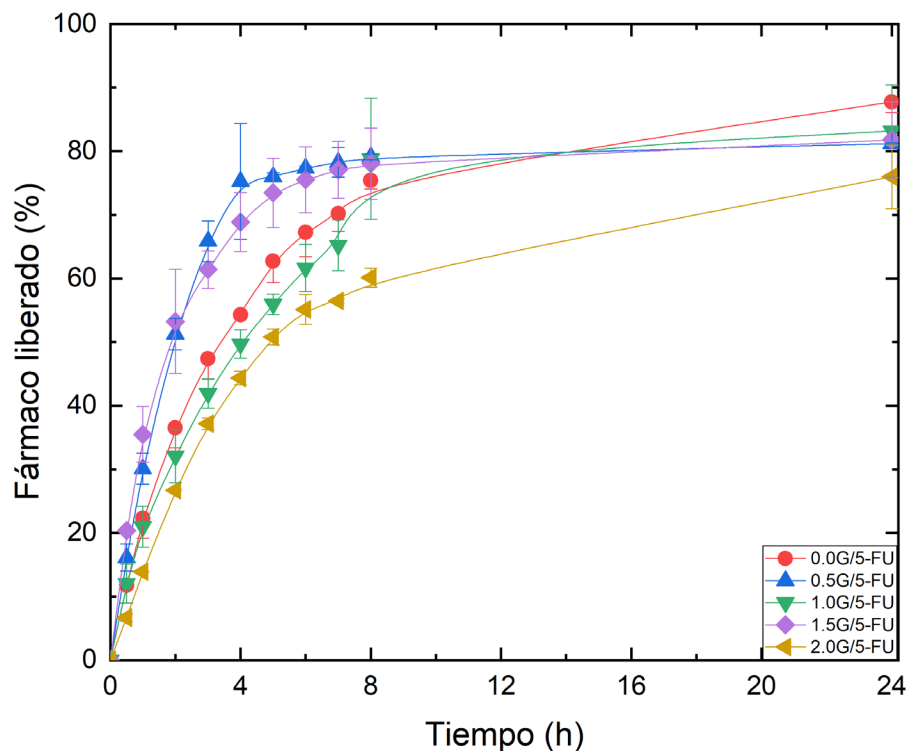


Figura 3.16. Perfiles de liberación *in vitro* del 5-FU de los dendrímeros.

### 3.4.5. Modelado de la cinética de liberación de 5-FU

Para representar el comportamiento de liberación del fármaco a partir de los complejos de PAMAM/5-FU, los datos se ajustaron a diferentes modelos cinéticos. En la Tabla 3.4 se resumen los resultados de los modelos utilizados para describir la cinética de liberación del 5-FU, donde se muestran los valores de la constante cinética ( $k$ ) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) para cada modelo. Como puede verse, los modelos que mejor describen los fenómenos de liberación de fármacos dependen del tipo de generación (media o completa) del dendrímero. Por lo tanto, los modelos de mejor ajuste para los dendrímeros de media generación fueron los de primer orden y Korsmeyer-Peppas, mientras que para los dendrímeros de generación completa los de mejor ajuste fueron los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

Tabla 3.4 Resultados de los modelos matemáticos utilizados para describir las curvas de liberación de 5-FU.

Muestra	Orden cero		Primer orden		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hixon-Crowell	
	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1/2</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-n</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1/3</sup> )
5-FU	0.489	4e-5	0.939	-0.0001	0.926	0.0065	0.952	0.028	0.836	3e-5
0.0G/5-FU	0.845	4e-5	0.995	-7e-5	0.986	0.0051	0.984	0.0056	0.973	2e-5
0.5G/5-FU	0.589	4e-5	0.962	-0.0001	0.934	0.0066	0.943	0.013	0.884	3e-5
1.0G/5-FU	0.903	4e-5	0.862	-8e-5	0.977	0.005	0.975	0.0056	0.948	2e-5
1.5G/5-FU	0.523	4e-5	0.978	-0.0001	0.947	0.0064	0.972	0.017	0.887	3e-5
2.0G/5-FU	0.887	3e-5	0.990	-6e-5	0.963	0.0047	0.960	0.0052	0.969	2e-5

### 3.5. Estudios de liberación *in vitro* a partir de las tabletas recubiertas con goma guar

#### 3.5.1. Efecto del pH y tiempo sobre los recubrimientos de GG

El porcentaje de fármaco liberado a partir de las tabletas recubiertas con diferentes concentraciones de goma guar en diferentes medios fisiológicos se muestra en Figura 3.17. Se observó que tres formulaciones permanecieron casi intactas y conservaban sus recubrimientos después de las 24 h, además se observó un ligero hinchamiento en las tabletas debido a la absorción del agua. Sin embargo, la tableta recubierta con la formulación más baja de goma guar (100 mg) se rompió en el medio fisiológico que simulaba al estómago (HCl 0.1 N) liberando la mayor cantidad de su carga y, por lo tanto, no se estudió más. Por otro lado, aproximadamente el 10% del fármaco se liberó en los medios que simulaban el tracto gastrointestinal superior. Así, los recubrimientos de goma guar pueden evitar que el fármaco se libere en el entorno fisiológico del estómago y el intestino delgado. La pequeña liberación observada en estos medios podría deberse a la disolución de las partículas del fármaco que quedan adsorbidas en los alrededores de la tableta, y su posterior difusión. Los resultados de los estudios de liberación *in vitro* demuestran que la goma guar es capaz de proteger al fármaco en distintos medios del tracto gastrointestinal, soportando el gradiente de pH durante largos periodos de tiempo.

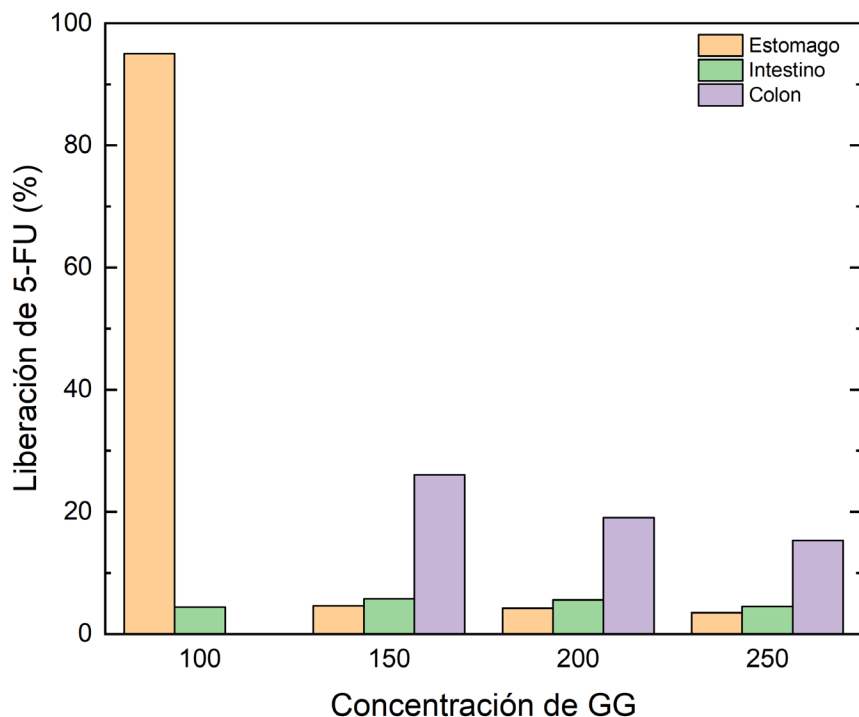


Figura 3.17. Liberación del 5-FU a partir de los recubrimientos de GG en medios que simulan el PH del estómago, intestino y colon.

### 3.5.2. Efecto de la actividad enzimática sobre los recubrimientos de GG

Los resultados de la liberación del fármaco de las tabletas cuando se sometieron a estudios de liberación *in vitro* que simulaban los medios del estómago, el intestino delgado, y el colon con la enzima endo-1,4- $\beta$ -mananasa se muestran en la Figura 3.18. Como se puede observar, menos del 15% del fármaco se liberó en los medios fisiológicos del estómago e intestino y la mayor parte del contenido se liberó en el medio que contenía la enzima de mananasa. Estos resultados demuestran la capacidad de protección que presenta la goma guar contra los medios ácidos y básicos y, también su susceptibilidad a la degradación enzimática producida en el colon humado. A partir de estos resultados, se utilizó la formulación con 250 mg de GG para elaborar tabletas que contenían los complejos de dendrímero/fármaco ya que fue la que presentó mejores resultados.

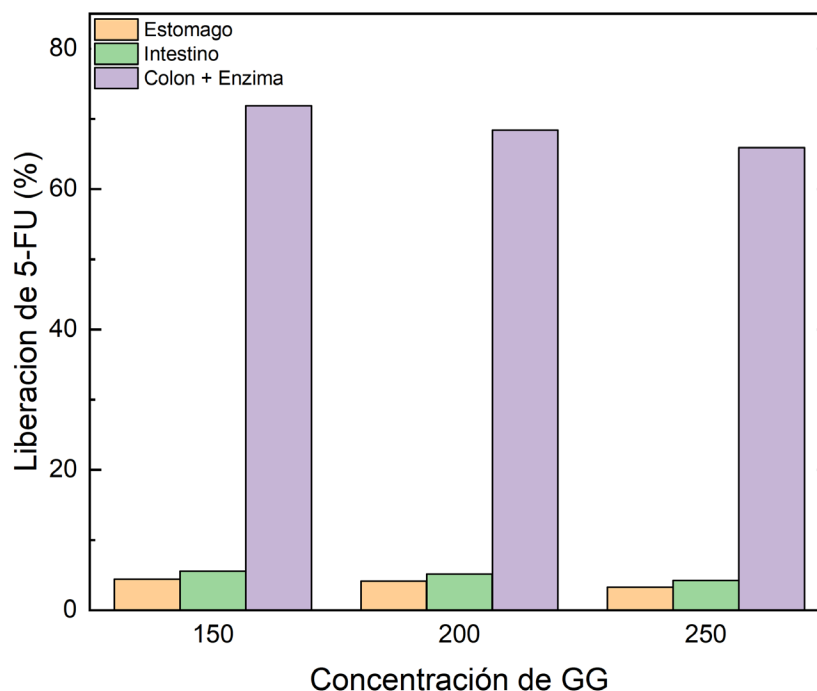


Figura 3.18. Liberación del 5-FU a partir de los recubrimientos de GG en medios que simulan el estómago, intestino y colon humano (enzima de mananasa).

### 3.5.3. Efecto del tiempo, pH y de la actividad enzimática sobre los complejos de dendrímero/fármaco, recubiertos con GG

En la Figura 3.19 se muestra el porcentaje de 5-FU liberado de los complejos de dendrímero/fármaco que estaban recubiertos con GG (250 mg) cuando se mantuvieron en medios fisiológicos que simulaban el estómago, intestino y colon. De manera general, se observó que la GG fue capaz de proteger a todos los complejos del ambiente ácido del estómago y básico del intestino, solo un pequeño porcentaje (< 5%) se liberó de las formulaciones. Por otro lado, cuando las tabletas se mantuvieron en el medio que simulaba al colon, se encontró que la cantidad de 5-FU liberada fue menor a la observada en las formulaciones que contenían el fármaco puro (ver Figura 3.18), lo que indica que el medicamento no terminaba de liberarse de los dendrímeros. También se observó que la cantidad liberada a partir de los complejos 0.5G y 1.5G fue mayor que en los demás complejos, esto puede deberse a la mayor tasa de liberación del 5-FU a partir de los dendrímeros de media generación y, concuerda con lo observado en las pruebas de liberación *in vitro* por diálisis (ver sección 6.3). Estos resultados sugieren que la GG es

capaz de brindar protección a los nanoacarreadores de fármacos a base de dendrímeros contra el ambiente fisiológico del tracto gastrointestinal, por lo tanto, pueden ser utilizados como vectores de liberación controlada y focalizada, una vez que entran en contacto con las enzimas localizadas en el colon humano.

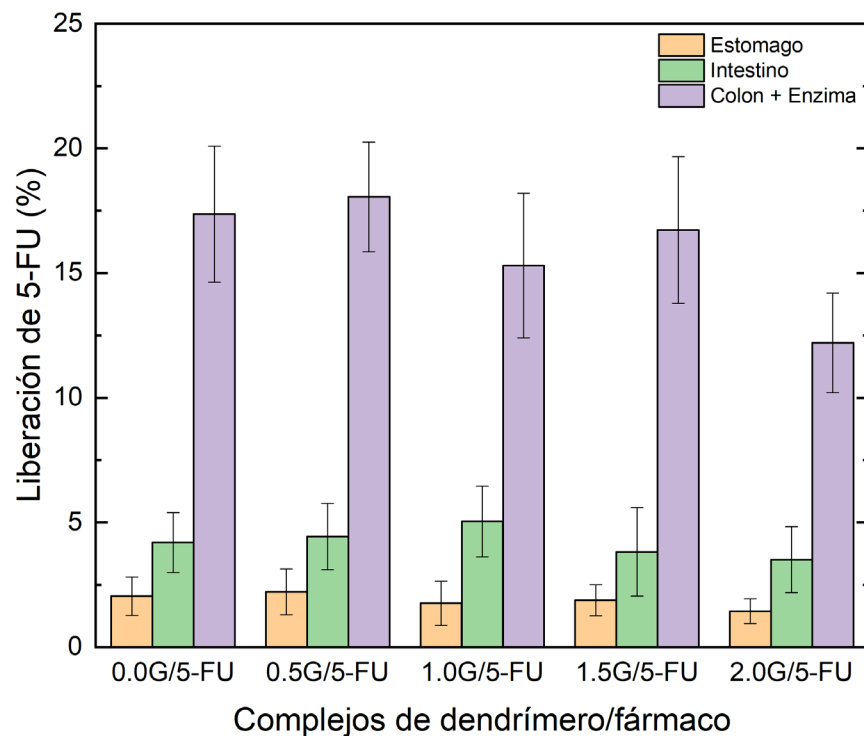


Figura 3.19. Liberación del 5-FU de los complejos de PAMAM/5-5FU recubiertos con GG en medios que simulan el estómago, intestino y colon humano (enzima de mananasa).



## CONCLUSIONES

En este trabajo se sintetizaron dendrímeros de PAMAM y la síntesis se confirmó mediante FTIR, UV-vis, <sup>1</sup>H-NMR, DLS y TGA. Los dendrímeros obtenidos se utilizaron para preparar complejos con el fármaco 5-FU, la formación de los complejos se demostró a partir de las interacciones detectadas mediante FTIR, UV-vis y TGA. Los estudios de EDX de los complejos PAMAM/5-FU confirmaron la presencia de flúor en todos los dendrímeros. Se observó que la eficiencia de encapsulación no depende del tamaño del dendrímero, sino del tipo de generación. Los estudios de liberación *in vitro* por diálisis demostraron que la liberación del 5-FU a partir de los dendrímeros de generación completa ocurre más lenta que la obtenida por los dendrímeros de media generación; se encontró que el modelo de Korsmeyer-Peppas es el que mejor describe la cinética de liberación del 5-FU para todos los complejos. Los estudios de liberación *in vitro* que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal demostraron que los complejos de PAMAM/5-FU recubiertos con GG son capaces de resistir los medios fisiológicos que simulan el estómago y el intestino, y que el recubrimiento de GG se degrada por la enzima de mananasa, liberando su carga. Los resultados confirman que los dendrímeros de baja generación (0.0G-2.0G) recubiertos con GG son un sistema de liberación adecuado para aplicaciones de administración de fármacos de manera controlada y específica en el colon.

## ANEXOS

### Anexo 1

Aunque algunos autores [59,60] recomiendan utilizar los monómeros sin purificación, en este trabajo cuando se realizó la síntesis sin purificar la etilendiamina, se observaron impurezas en el producto obtenido, por lo tanto, se recomienda destilar la amina previo a la síntesis de los dendrímeros de PAMAM como recomienda Tomalia *et al* [40].



Figura A1. Impurezas en la síntesis de dendrímeros de PAMAM.

Por otra parte, algunos autores [6,40] recomiendan secar los dendrímeros de generación completa después de la destilación, en este trabajo se observó que el secado puede generar productos, probablemente entrecruzados, como el observado en la Figura A2. Por tal motivo, se recomienda liofilizar el producto resultante de la destilación en lugar del secado, ya que en este método las condiciones de secado son a temperaturas bajo 0 °C.



Figura A2. Dendrímeros defectuosos debido al secado.

## Anexo 2

La micrografía de TEM (Figura A3) del dendrímero 0.0G mostró que las partículas tienen forma esférica y se encuentran altamente aglomerados.

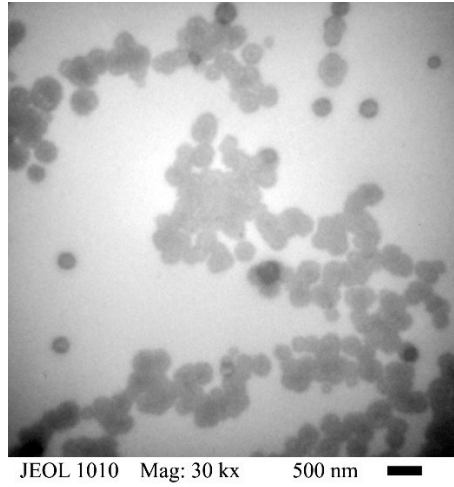


Figura A3. Microscopia de TEM del dendrímero de PAMAM (0.0G).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sandoval-Yañez C, Rodriguez CC. Dendrimers: Amazing platforms for bioactive molecule delivery systems. *Materials (Basel)*. 13, 1-20, 2020.
- [2] Ortega MÁ, Merino AG, Fraile-Martínez O, Recio-Ruiz J, Pekarek L, Guijarro LG. Dendrimers and dendritic materials: From laboratory to medical practice in infectious diseases. *Pharmaceutics*. 12, 1–27, 2020.
- [3] Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW. Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett*. 9, 1–10, 2014.
- [4] Boas U, Heegaard PMH. Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev*. 33, 43–63, 2004.
- [5] Tomalia DA, Fréchet MJJ. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective. *Polym J*. 40, 2719–2728, 2002.
- [6] Singh P, Gupta U, Asthana A, Jain NK. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjugate Chem*. 19, 2239–2252, 2008.
- [7] Mittal P, Saharan A, Verma R, Altalbawy FMA, Alfaidi MA, Batiha GES. Dendrimers: A new race of pharmaceutical nanocarriers. *Biomed Res Int*. 2021, 1–11, 2021.
- [8] Kolhe P, Misra E, Kannan RM, Kannan S, Lieh-lai M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int J Pharm*. 259, 143–160, 2003.
- [9] Ke W, Zhao Y, Huang R, Jiang C, Pei Y. Enhanced oral bioavailability of doxorubicin in a dendrimer drug delivery system. *J Pharm Sci*. 97, 2208–2216, 2008.
- [10] Zhu J, Shi X. Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications. *J Mater Chem B*. 1, 4199–4211, 2013.
- [11] Yiyun C, Na M, Tongwen X, Rongqiang F, Xueyuan W, Xiaomin W. Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. *J Pharm Sci*. 96, 595–601, 2007.
- [12] Chauhan AS, Jain NK, Diwan PV, Khopade AJ. Solubility enhancement of indomethacin with poly(amidoamine) dendrimers and targeting to inflammatory

- regions of arthritic rats. *J Drug Target.* 12, 575–583, 2004.
- [13] Ganeshkumar M, Janani M, Ponrasu T, Suguna L. Guar gum stabilized gold nanoparticles for colon cancer. *Clin Oncol.* 3, 1–8, 2018.
- [14] Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm.* 394, 122–142, 2010.
- [15] Janaszewska A, Lazniewska J, Trzepiński P, Marcinkowska M, Klajnert-Maculewicz B. Cytotoxicity of dendrimers. *Biomolecules.* 9, 1–23, 2019.
- [16] Ji CM, Xu HN, Wu W. Guar gum as potential film coating material for colon-specific. *J Biomater Appl.* 1, 1–20, 2008.
- [17] Krishnaiah YSR, Satyanarayana S, Prasad YVR, Rao SN. Evaluation of guar gum as a compression coat for drug targeting to colon. *Int J Pharm.* 171, 137–146, 1998.
- [18] Tuğcu-Demiröz F, Acartürk F, Takka S, Konuş-Boyunağa Ö. In-vitro and in-vivo rvaluation of mesalazine-guar gum matrix tablets for colonic drug delivery. *J Drug Target.* 12, 105–112, 2004.
- [19] Twibanire JAK, Grindley TB. Polyester dendrimers. *Polymers (Basel).* 4, 794–879, 2012.
- [20] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S. A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polym J.* 17, 117–132, 1985.
- [21] Öztürk K, Ertürk AS, Sarisözen C, Tulu M, Çalış S. Cytotoxicity and in vitro characterization studies of synthesized Jeffamine-cored PAMAM dendrimers. *J Microencapsul.* 31, 1–10, 2013.
- [22] Sabahi Z, Samani SM, Dehshahri A. Conjugation of poly(amidoamine) dendrimers with various acrylates for improved delivery of plasmid encoding interleukin-12 gene. *J Biomater Appl.* 29, 941–953, 2015.
- [23] Majoros I, Williams CR, , Baker JR. New Dendrimers: Synthesis and characterization of Popam – Pamam hybrid dendrimers. *Macromolecules.* 41, 8372–8379, 2008.
- [24] Ma M, Cheng Y, Xu Z, Xu P, Qu H, Fang Y. Evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carriers of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug. *Eur J Med Chem.* 42, 93–98, 2007.
- [25] Madaan K, Lather V, Pandita D. Evaluation of polyamidoamine dendrimers as

- potential carriers for quercetin, a versatile flavonoid. *Drug Deliv.* 23, 254–262, 2016.
- [26] Rajpurohit H, Sharma S, Bhandari A. Polymers for colon targeted drug delivery. *Indian J Pharm Sci.* 72, 689–696, 2010.
- [27] Krishnaiah YSR, Satyanarayana S, Rama Prasad YV, Narasimha Rao S. Gamma scintigraphic studies on guar gum matrix tablets for colonic drug delivery in healthy human volunteers. *J Control Release.* 55, 245–252, 1998.
- [28] Krishnaiah YSR, Veer Raju P, Dinesh Kumar B, Satyanarayana V, Karthikeyan RS, Bhaskar P. Pharmacokinetic evaluation of guar gum-based colon-targeted drug delivery systems of mebendazole in healthy volunteers. *J Control Release.* 88, 95–103, 2003.
- [29] Chaurasia M, Chourasia MK, Jain NK, Jain A, Soni V, Gupta Y. Cross-linked guar gum microspheres: A viable approach for improved delivery of anticancer drugs for the treatment of colorectal cancer. *AAPS PharmSciTech.* 7, 1–9, 2006.
- [30] Garg A, Singhvi I. Concepts of sustained release dosage forms. *IJAPBR.* 1, 22–43, 2016.
- [31] Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ Quim.* 27, 286–291, 2016.
- [32] Nanjwade BK, Bechra HM, Derkar GK, Manvi F, Nanjwade VK. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* 38, 185–196, 2009.
- [33] Esfand R, Tomalia DA. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Res Focus.* 6, 427–436, 2001.
- [34] Tomalia DA. The dendritic state. *Mater Today.* 8, 34–46, 2005.
- [35] van Dongen MA, Desai A, Orr BG, Baker Jr JR, Holl MB. Quantitative analysis of generation and branch defects in G5 poly(amidoamine) dendrimer. *Polymer.* 54, 4126–4133, 2013.
- [36] Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res.* 62, 90–99, 2010.
- [37] Liu L, Fishman ML, Kost J, Hicks KB. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials.* 24, 3333–3343, 2003.

- [38] Garrett RH, Grisham CM. Biochemistry. Cengage Learning; 5th ed. 2013, 481-509.
- [39] Yang L, Chu JS, Fix JA. Colon-specific drug delivery: New approaches and in vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 235, 1–15, 2002.
- [40] Esfand R, DA T. Laboratory synthesis of Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers.* John Wiley & Sons Ltd. 2001, 587–603.
- [41] Nguyen DH, Bach LG, Tran DHN, Cao V Du, Nguyen TNQ, Le TTH. Partial surface modification of low generation polyamidoamine dendrimers: Gaining insight into their potential for improved carboplatin delivery. *Biomolecules.* 9, 1–16, 2019.
- [42] International ASTM D 3132 – 84. Standard test method for solubility range of resins and polymers. 1–5, 1996.
- [43] Petrelli N, Herrera L, Rustum Y, Burke P, Creaven P, Stulc J. A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol.* 5, 1559–1565, 1987.
- [44] Thyss A, Milano G, Renée N, Vallicioni J, Schneider M, Demard F. Clinical pharmacokinetic study of 5-FU in continuous 5-day infusions for head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 16, 64–66, 1986.
- [45] Carmona P, Moreno J. The infrared spectra and structure of methyl acrylate. *J Mol Struct.* 82, 177–185, 1982.
- [46] Janus E, Gano M, Feder-Kubis J, Sośnicki J. Chiral protic imidazolium salts with a (-)-menthol fragment in the cation: Synthesis, properties and use in the Diels-Alder reaction. *RSC Adv.* 8, 10318–10331, 2018.
- [47] Segal L, Eggerton F V. Infrared spectra of ethylenediamine and the dimethylethylenediamines. *Appl Spectrosc.* 15, 116–117, 1961.
- [48] Zaid MHM, Abdullah J. Preparation and characterization of amine functionalized graphene oxide with water soluble quantum dots for sensing material. *AIP Conf. Proc.* 1–6, 2017.
- [49] Skoog DA, Holler FH, Nieman TA. Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning; 6th ed. 2007, 367-370.
- [50] Chawla M, Kaushik RD, Singh J. Optimization and computational studies evaluating molecular dynamics of EDA cored polymeric dendrimer. *Sci Rep.* 10, 1–10, 2020.

- [51] Sohail I, Bhatti IA, Ashar A, Sarim FM, Mohsin M, Naveed R. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers synthesis, characterization and adsorptive removal of nickel ions from aqueous solution. *J Mater Res Technol.* 9, 498–506, 2020.
- [52] Christian GD. Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Inc; 6th ed. 2003, 465-467.
- [53] Bertero A, Boni A, Gemmi M, Gagliardi M, Bifone A, Bardi G. Surface functionalisation regulates polyamidoamine dendrimer toxicity on blood-brain barrier cells and the modulation of key inflammatory receptors on microglia. *Nanotoxicology.* 8, 158–168, 2014.
- [54] Geitner NK, Wang B, Andorfer RE, Ladner DA, Ke PC, Ding F. Structure–function relationship of PAMAM dendrimers as robust oil dispersants. *Environ Sci Technol.* 48, 12868–12875, 2014.
- [55] Akalin E, Akyuz S, Akyuz T. Adsorption and interaction of 5-fluorouracil with montmorillonite and saponite by FT-IR spectroscopy. *J Mol Struct.* 834, 477–481, 2007.
- [56] Reddy YD, Dhachinamoorthi D, Sekhar KBC. Formulation and in vitro evaluation of antineoplastic drug loaded nanoparticles as drug delivery system. *Afr J Pharm Pharmacol.* 7, 1592–1604, 2013.
- [57] Moisescu-Goia C, Muresan-Pop M, Simon V. New solid state forms of antineoplastic 5-fluorouracil with anthelmintic piperazine. *J Mol Struct.* 1150, 37–43, 2017.
- [58] Cojocaru IC, Ochiuz L, Spac A, Popa G, Palade L, Popovici I. The validation of the UV spectrophotometric method for the assay of 5 fluorouracil. *Farmacia.* 60,379–385, 2012.
- [59] Walke PM, Meshram JS. Synthesis and characterization of inclusion complex of carbamide with extremely branched, globular, monodisperse, nanometric starburst PAMAM dendrimer. *Adv Mater Proc.* 5, 1–7, 2020.
- [60] Ertürk AS, Bozdoğan AE, Tülü M. Application of chemometric methods to the purity analysis of PAMAM dendrimers. *Chem Pap.* 71, 127–135, 2017.