

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES

“Estudio del comportamiento de hidrogeles de poli(ácido-
gamma-glutámico) en la liberación controlada de fármacos”

TODOS LO ILUMINAN

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencia de Materiales

Presenta:

Lic. Eleany Borges Hernández

Director de Tesis

Dra. Dora Evelia Rodríguez-Félix

1942

Hermosillo, Sonora

Julio de 2021

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Eleany Borges Hernández, han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente comorequisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales, otorgado por la Universidad de Sonora.



Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix
Presidente



Dr. Jesús Manuel Quiroz Castillo
Secretario



Dra. Teresa del Castillo Castro
Sinodal



Dra. Juana Alvarado Ibarra Sinodal



Dra. Celia Olivia García Sifuentes
Sinodal Externo

Dedicatoria

A mis padres y a mi hermana Lumay

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.

Marie Curie

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, por haberme abierto sus puertas y permitir que cursara el posgrado de Ciencia de Materiales; así como los recursos otorgados para poder dar cumplimiento a esta investigación. Agradecer también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que se me fue otorgada.

A mis sinodales, por cada comentario y sugerencia brindada para la realización de este trabajo.

Agradezco especialmente a la directora de esta investigación, la Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix por haberme aceptado como su estudiante, por su apoyo incondicional, por sus excelentes consejos, su paciencia y su sabiduría. Gracias por ser tan increíble y por convertirse para mí en un ejemplo de investigadora, profesora y de ser humano.

A la Dra. Silvia Burruel, la Dra. Irela Santos y al Dr. Refugio Pérez por su ayuda y colaboración para la caracterización de los materiales empleados en este proyecto.

A todos los profesores que se han encargado de mi formación académica antes y durante el desarrollo del posgrado. Gracias por sus valiosas enseñanzas.

A la Dra. Hisila Santacruz por todo su apoyo brindado desde que estaba en Cuba y a Edna por su amistad incondicional, por toda su ayuda y amabilidad.

A mis coterráneas Ana Daymi y Yaniris porque a través de ellas pude conocer este posgrado, gracias por su amistad, por guiarme y compartirme sus experiencias en todo momento.

A mis compañeros del posgrado por su grato recibimiento y por aportar cada granito de cultura sonorenses.

A los amigos que esta etapa de la vida me regaló: Katia, Jeisson, Amed, Brianda, Denia, Chema, Lupe, Cristian, Martín y Jerónimo. Gracias por todos los momentos compartidos a su lado.

A las roomies con las que he vivido especialmente a Steph y Ahimé por su recibimiento. A mi odontóloga Ana Leticia y a mi piscis Leslie, gracias por su amistad incondicional y por cada consejo.

A mis ex compañeras de trabajo y a mis amigos que desde Cuba siempre me brindaron el soporte emocional para seguir adelante.

A mi familia, gracias por resistir la distancia para verme crecer profesional y personalmente. Gracias por ser mi motor impulsor y mi inspiración. A mis padres por su amor infinito e inigualable. A mi segunda madre María Josefa. A Lumay, la mejor hermana que existe y la más orgullosa de mis logros. A mis hermanos Yasmani y Ramón. A todos, gracias.

Índice

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	ii
APROBACIÓN DE TESIS	¡Error! Marcador no definido.
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción	3
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
2. Antecedentes	6
2.1. Hidrogeles	6
2.1.1 Clasificación de los Hidrogeles	7
2.2 Poli(ácido- α -glutámico).....	11
2.2.1 Nomenclatura	12
2.2.2 Estructura Química	12
2.2.3 Biosíntesis	13
2.2.4 Aplicaciones.....	14
2.3 Aplicaciones de los hidrogeles	15
2.3.1 Liberación controlada de fármacos.....	16
2.4 Sulfato de neomicina.....	17
2.5 Aplicación de modelos matemáticos en los sistemas de liberación controlada de fármacos.....	18
2.5.1 Modelo de orden cero	19
2.5.2 Modelo de Higuchi	19
2.5.3 Modelo de Korsmeyer-Pepas	20
2.6 Técnicas de caracterización.....	20
2.6.1 Espectroscopia Infrarroja. Aspectos fundamentales.....	20
2.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido	25
2.6.3 Análisis Térmico.....	27
2.7 Biocompatibilidad	28
2.7.1 Citotoxicidad	29

3. Desarrollo Experimental	31
3.1 Reactivos	31
3.2 Síntesis de hidrogeles de poli(ácido α-glutámico)	32
3.3 Incorporación del sulfato de neomicina a la matriz polimérica	33
3.3.1 Preparación de la curva de calibración para la medición de la concentración de neomicina	33
3.3.2 Cargado del sulfato de neomicina en los hidrogeles.....	33
3.4 Caracterización de los hidrogeles cargados con sulfato de neomicina	34
3.4.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	34
3.4.2 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	35
3.4.3 Microscopía Electrónica de Barrido.	35
3.5 Ensayos <i>in vitro</i> de liberación de sulfato de neomicina.....	35
3.5.1 Preparación de soluciones buffer.....	35
3.5.2 Evaluación del efecto del pH y de la temperatura sobre la cinética de liberación	36
3.6 Estudios de Biocompatibilidad	36
3.6.1 Cultivo Celular	36
3.6.2 Preparación de la muestra.....	37
3.6.3 Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad.....	37
4. Resultados y discusión	39
4.1 Síntesis de hidrogeles de poli(ácido α-glutámico)	39
4.2 Caracterización de los hidrogeles cargados con sulfato de neomicina	40
4.2.1 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR).....	40
4.2.2 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	41
4.2.3 Microscopía electrónica de barrido	44
4.3 Ensayos <i>in vitro</i> de liberación del sulfato de neomicina	44
4.4 Ajuste de la liberación a modelos matemáticos.	47
4.5 Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad.....	49
5. Conclusiones	50
6. Recomendaciones	51
7. Referencias	52
8. Anexos	59

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema molecular de un hidrogel.....	6
Figura 2.	Clasificación de los hidrogeles.....	7
Figura 3.	Representación de redes semi interpenetradas.....	10
Figura 4.	Representación de redes interpenetradas.....	10
Figuro 5.	Hidrogeles sensibles a estímulos.....	11
Figura 6.	Estructura química del poli(ácido- γ -glutámico).....	12
Figura 7.	Ruta biosintética del γ -PGA en especies <i>Bacillus</i> dependientes e independientes del ácido L-glutámico, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).....	14
Figura 8.	Representación de las concentraciones plasmáticas en sistemas de liberación convencional y controlada.....	16
Figura 9.	Estructura química del sulfato de neomicina.....	17
Figura 10.	Frecuencias vibracionales para algunos enlaces.....	21
Figura 11.	Esquema de un sistema óptico de un espectrofotómetro FT-IR.....	23
Figura 12.	Fundamento de la técnica de ATR.....	24
Figura 13.	Componentes del microscopio óptico.....	25
Figura 14.	Representación de un termoanalizador.....	28
Figura 15.	Reducción de resarzurina a resorufurina.....	30
Figura 16.	Diagrama de flujo “Síntesis de hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico).....	32
Figura 17.	Curva de calibración del sulfato de neomicina.....	33
Figura 18.	Hidrogeles cargados con sulfato de neomicina.....	34
Figura 19.	Ensayo <i>in vitro</i> de liberación.....	36
Figura 20.	Hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico).....	39
Figura 21.	Reacción de entrecruzamiento.....	39

Figura 22.	Espectros IR de la neomicina, el γ -PGA y el hidrogel cargado con neomicina.....	40
Figura 23.	Termogramas TGA y DTA neomicina.....	42
Figura 24.	Termogramas TGA y DTA Hidrogel γ -PGA.....	42
Figura 25.	Termogramas TGA y DTA Hidrogel γ -PGA con neomicina.....	43
Figura 26.	Microscopía Electrónica de Barrido de Hidrogeles de γ -PGA con neomicina.....	44
Figura 27.	Ensayo de liberación a 25°C.....	45
Figura 28.	Ensayo de liberación a 37°C.....	45
Figura 29.	Evaluación de la citotoxicidad para diluciones de hidrogel de γ -PGA.....	49

Lista de Tablas

Tabla 1. Resultados análisis TGA, de la neomicina y de los hidrogeles sin fármaco y cargados con sulfato de neomicina.....	43
Tabla 2. Modelos matemáticos en su forma lineal.....	47
Tabla 3. Coeficientes de correlación.....	47
Tabla 4. Exponente de liberación n y constante cinética K del modelo Korsmeyer-Peppas.....	48

Resumen

Actualmente el uso de biomateriales es una alternativa interesante para lograr la administración en tiempo, cantidad y lugar requerido de medicamentos, ya que con los métodos tradicionales no se obtiene un control eficaz de este proceso. Los hidrogeles sintetizados a partir de biopolímeros constituyen materiales ampliamente utilizados para esta aplicación. En este sentido, en el presente trabajo se sintetizaron hidrogeles de poli(ácido-gamma-glutámico) y se evaluó su comportamiento como sistema de liberación controlada de sulfato de neomicina, a diferentes valores de pH y temperatura. Para la determinación del mecanismo de liberación se realizó un ajuste a diferentes modelos matemáticos. La caracterización de los hidrogeles cargados con el fármaco se realizó mediante diferentes técnicas: Espectroscopia Infrarroja (FT-IR), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis Termogravimétrico (TGA), las cuales permitieron corroborar la presencia del fármaco en la matriz polimérica, así como evidenciar las interacciones entre el sulfato de neomicina y las cadenas del polímero. Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad de los hidrogeles en diferentes concentraciones, empleando la línea celular L929. Los ensayos *in vitro* de liberación demostraron que esta aumentó tanto con el incremento de la temperatura y como del pH. Los datos obtenidos se ajustaron mejor al modelo de Korsmeyer-Peppas y los valores del exponente de liberación indican que esta ocurre mediante un mecanismo de difusión "anómala". Los hidrogeles también fueron biocompatibles a las concentraciones de 3.125 mg/mL, 6.250 mg/mL, 12.5 mg/mL, y 25 mg/mL.

Abstract

Nowadays, the use of biomaterials is an interesting alternative to achieve the optimal administration of drugs controlling the time and quantity in the required region, given the fact that with traditional methods an effective control of this process is not obtained. Hydrogels synthesized from biopolymers are widely used for this application. In the present work, poly(γ -glutamic acid) hydrogels were synthesized and their behaviour as a controlled release system for neomycin sulfate was evaluated at different pH and temperature values. To determine the release mechanism, an adjustment was made to different mathematical models. The characterization of the hydrogels loaded with desired drug was carried out using different techniques: Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Thermo-gravimetric Analysis (TGA), which allowed to corroborate the presence of the drug in the polymeric matrix, as well as demonstrating the interactions between neomycin sulfate and the polymer chains. Furthermore, hydrogels cytotoxicity tests were performed at different concentrations, using the L929 cell line. *In vitro* release tests showed that with this approach, the cytotoxicity was increased with increments of the temperature and pH. The obtained data was adjusted to the Korsmeyer-Peppas model and the values of the released exponent indicate that the process occurs through an "abnormal" diffusion mechanism. The hydrogels were also biocompatible at concentrations of 3,125 mg/mL, 6,250 mg/mL, 12.5 mg/mL, and 25 mg/mL.

1. Introducción

La principal problemática de los sistemas convencionales de liberación de fármacos está dada por las constantes fluctuaciones de concentración plasmática entre los niveles de toxicidad e ineficacia del medicamento, por lo cual es necesario administrar varias dosis a los pacientes para lograr el efecto deseado. Para su solución se han desarrollado nuevos sistemas de liberación controlada que mantienen la concentración del fármaco en el rango terapéutico por un tiempo prolongado. El hecho de que la liberación ocurra de manera controlada, supone grandes ventajas: se logra un mejor cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, se amplía el intervalo de dosificación y disminuyen el número de dosis y de efectos secundarios [1].

Cabe resaltar que en la actualidad muchos de los sistemas de liberación controlada están formados por matrices poliméricas y estos pueden ser localizados virtualmente en cualquier cavidad corporal, de modo que estos soportes de fármacos pueden situarse en el organismo en, o cerca de la zona enferma, pueden ser implantados, o pueden ser adheridos externamente a la piel, gracias a ello han aparecido nuevas rutas posibles de administración de fármacos. Se ha investigado la administración sistémica de medicamentos a través de las membranas nasales (ruta nasal), de las membranas mucosas de la boca (ruta oral), del ojo (ruta oftálmica), de la piel (ruta transdermal), entre otras. [2]

Entre los materiales empleados con este fin, destacan los hidrogeles, los cuales son materiales poliméricos blandos, elásticos, insolubles en agua y con carácter hidrofílico, lo que les permite absorber grandes cantidades de agua, aumentando considerablemente su volumen pero manteniendo su forma hasta alcanzar un equilibrio físico-químico [3]. Están conformados por homopolímeros o copolímeros

y uno o varios agentes entrecruzantes que unidos mediante enlaces covalentes o interacciones no covalentes, forman una estructura entrecruzada [4].

Los geles poliméricos resultan atractivos como materiales inteligentes o biomiméticos, puesto que responden a cambios fisicoquímicos en su entorno tales como: la composición del solvente, la temperatura, el pH y otros. Estas características han generado que sean investigados ampliamente en cuanto a optimizar su síntesis para diseñar la relación "estímulo-respuesta", en el desarrollo de sensores de múltiples aplicaciones [5,6]. Este singular comportamiento de los geles, aunado a que durante su síntesis puede incorporárseles características como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, naturaleza inerte, buenas propiedades mecánicas, alta resistencia química y térmica, entre otros, ha abierto las puertas a una amplia variedad de aplicaciones tecnológicas en química, medicina, medio ambiente, agricultura, y en otros campos [7].

Particularmente los biopolímeros son muy atractivos para su aplicación como sistemas de liberación controlada de fármacos. Estos materiales una vez introducidos en el cuerpo humano, no requieren remoción ni manipulación adicional. Sus productos de degradación son metabolitos normales del cuerpo o productos que pueden metabolizarse y eliminarse fácilmente del mismo [8]. Un biopolímero prometedor en este sentido lo constituye el poli(ácido- γ -glutámico), este es soluble en agua, biodegradable, comestible y no tóxico. Estas características han despertado el interés de diversos autores por este polímero y se ha estudiado la posibilidad de emplearlo en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas [9].

En el presente trabajo se sintetizaron hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico) entrecruzados con urea, se evaluó su comportamiento como sistema de liberación de fármacos a diferentes valores de temperatura y pH y se determinó el mecanismo de liberación mediante modelos matemáticos. Como fármaco modelo se empleó el sulfato de neomicina y los modelos matemáticos empleados para determinar el mecanismo de liberación del fármaco fueron el modelo de orden cero, el modelo de Higuchi y el modelo de Korsmeyer-Peppas.

Hipótesis

Hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico) entrecruzados con urea, presentan una liberación controlada de sulfato de neomicina y son materiales biocompatibles para aplicaciones biomédicas.

Objetivo general

- Analizar el comportamiento de los hidrogeles de γ -PGA como un sistema de liberación controlada de fármacos

Objetivos específicos

1. Sintetizar hidrogeles de poli(ácido γ -glutámico).
2. Caracterizar los hidrogeles de poli(ácido γ -glutámico) cargados con sulfato de neomicina mediante Espectroscopia Infrarrojo (FTIR), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis Termogravimétrico (TGA).
3. Determinar el efecto del pH y de la temperatura sobre la cinética de liberación del fármaco.
4. Determinar el mecanismo de liberación del fármaco mediante modelos matemáticos.
5. Evaluar la citotoxicidad de los hidrogeles de poli(ácido γ -glutámico).

2. Antecedentes

2.1. Hidrogeles

Los hidrogeles se definen como redes poliméricas, que son estabilizadas por entrecruzamiento químico o físico, las cuales absorben grandes cantidades de agua o fluidos conservando su estructura tridimensional (Figura 1) [10]. Como consecuencia de esto, son materiales suaves, flexibles y húmedos con potenciales aplicaciones biomédicas y desempeñan un papel crucial en las estrategias actuales para remediar las disfunciones y lesiones en los sistemas vivos. El alto contenido de agua de sus estructuras los hace compatibles con la mayoría de los tejidos vivos y su naturaleza viscoelástica minimiza el daño al tejido circundante cuando se implanta en el huésped [11,12].

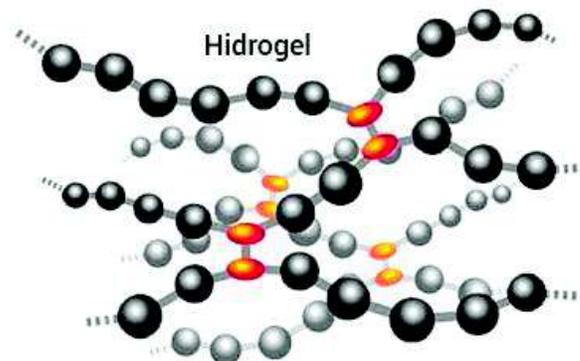


Figura 1. Esquema molecular de un hidrogel

La hidrofiliicidad de estos materiales se debe a la presencia de grupos como -OH, -COOH, -CONH-, -SO₃H, entre otros [13]. Además, en la actualidad se ha desarrollado una nueva generación de hidrogeles supramoleculares, los cuales

están formados por péptidos que contiene de 2 a 12 aminoácidos. En estas estructuras los péptidos se autoasocian mediante interacciones físicas formando redes tridimensionales que pueden contener aproximadamente un 99% de su peso en agua [14,15]. A diferencia de otros biomateriales, los hidrogeles forman estructuras porosas con alta permeabilidad que facilitan el intercambio de oxígeno, nutrientes y metabolitos [16].

2.1.1 Clasificación de los Hidrogeles

Debido a que hoy en día existe una gran diversidad de hidrogeles, estos poseen diversas clasificaciones de acuerdo con varios criterios tales como , el origen de los polímeros que lo conforman, el método de preparación, la naturaleza del entrecruzamiento, su composición, estructura química, carga iónica, etc. Las clasificaciones más comunes de estos materiales se representan en el esquema que se muestra a continuación (Figura 2)

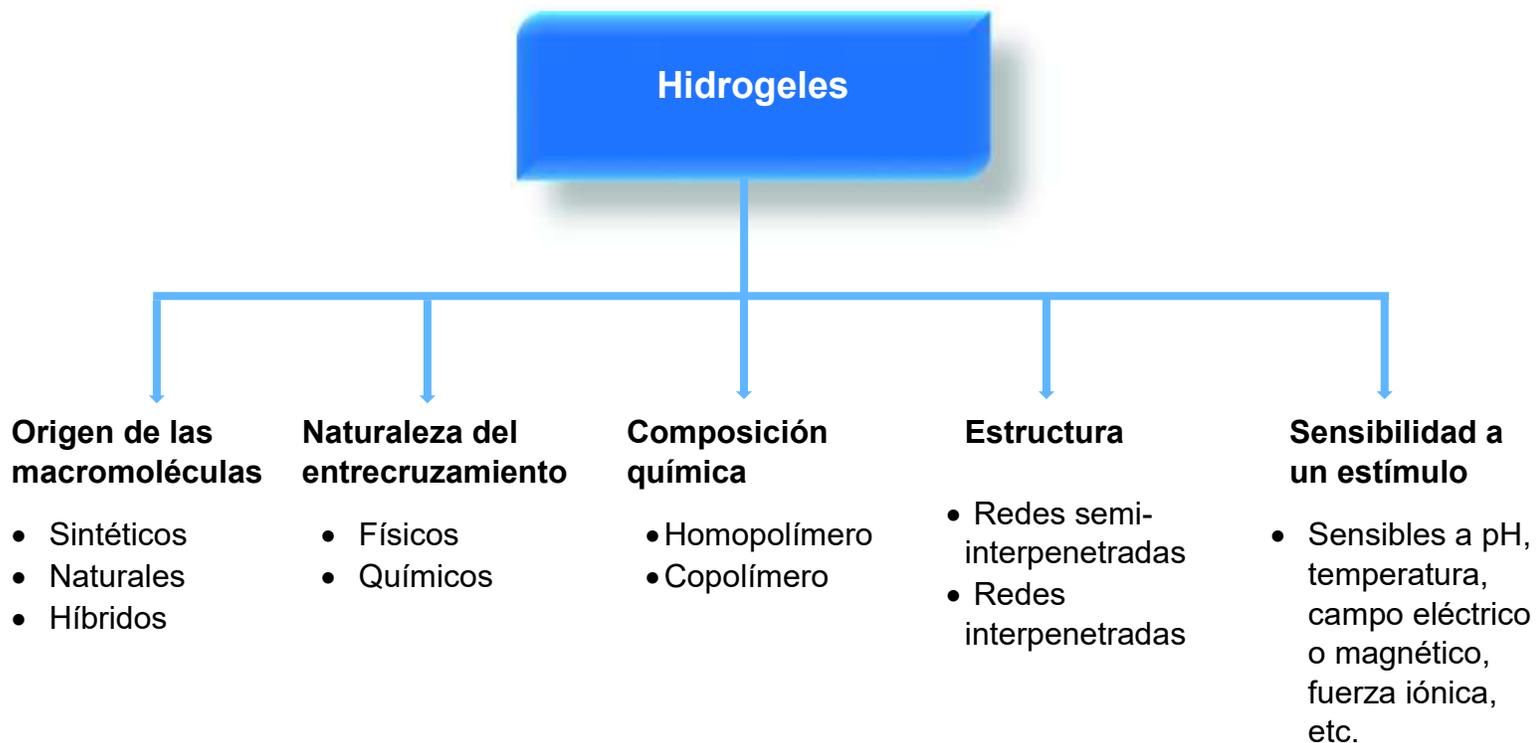


Figura 2. Clasificaciones de los hidrogeles

2.1.1.1 Según el origen de las macromoléculas

Los hidrogeles en base a su origen se clasifican en sintéticos, naturales e híbridos.

Hidrogeles sintéticos: son materiales sintetizados a partir de polímeros obtenidos en el laboratorio. El hecho de que exista un gran número de monómeros disponibles hace que en estos hidrogeles se puedan hacer modificaciones con gran facilidad. Las aplicaciones de los hidrogeles sintéticos abarcan materiales superabsorbentes para pañales y toallas femeninas, materiales para separación en química analítica (columnas de permeación en gel y electroforesis), etc. Ejemplos de este tipo de materiales son los hidrogeles de poliacrilamida [17].

Hidrogeles naturales: son aquellos que están sintetizados a partir de polímeros naturales, los cuales han sido muy utilizados en los últimos años debido a sus ventajas únicas. En general, son inocuos, abundantes y biocompatibles por lo cual sus principales aplicaciones son en la biomédica, aunque su principal limitante es que presentan baja resistencia a la acción de esfuerzos mecánicos [8]. Entre las fuentes de extracción de los polímeros naturales se encuentran las algas, cultivos bacterianos, fluidos biológicos, etc. Algunos ejemplos de hidrogeles naturales son la agarosa, el ácido hialurónico y el alginato [18].

Hidrogeles híbridos: su estructura está compuesta por dos tipos de moléculas diferentes: una de origen sintético y otra natural. Este tipo de hidrogel presenta propiedades superiores en comparación con el hidrogel convencional [19], ya que permite tener en un solo material propiedades de hidrogeles naturales y sintéticos como son la biocompatibilidad y la versatilidad respectivamente.

2.1.1.2 Según la naturaleza del entrecruzamiento

Según la naturaleza del entrecruzamiento, los hidrogeles se clasifican en físicos y químicos.

Hidrogeles físicos: presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables. Se denominan físicos o reversibles cuando las redes

se mantienen unidas por interacciones fisicoquímicas secundarias como: interacciones hidrófobas, condensación de cargas, enlaces por puente de hidrógeno, estereo-acomplejamientos, u otras interacciones supramoleculares. Estas interacciones aunque son débiles, son muy numerosas y su contribución a lo largo de toda la cadena polimérica da lugar a comportamientos muy complejos.

Hidrogeles químicos: consisten de redes entrecruzadas covalentemente. Generalmente contienen regiones de alta densidad de entrecruzamiento y bajo grado de hinchamiento (*clusters*), dispersas en las regiones de baja densidad de entrecruzamiento y alto índice de hinchamiento. En algunos casos, dependiendo de la composición, del disolvente, la temperatura y la concentración de sólidos durante la gelación, puede ocurrir separación de fases formándose macroporos.

2.1.1.3 Según la composición química

De acuerdo a su composición química los hidrogeles se clasifican en homopoliméricos y copoliméricos.

Hidrogeles homopoliméricos: corresponden a estructuras entrecruzadas formadas a partir de una sola especie de monómero [20], usualmente se emplean en el desarrollo de sistemas de almacenaje y en la liberación de sustancias, como por ejemplo fármacos. En la actualidad se han empleado en la biomedicina fundamentalmente debido a su carácter biodegradable y biocompatible con el organismo [21,22].

Hidrogeles copoliméricos: están formados por cadenas poliméricas compuestas por la combinación de dos tipos de monómeros donde al menos uno de ellos es hidrofílico que se entrecruzan dando lugar a una única red polimérica y han sido utilizados para la liberación de diversas sustancias, incorporándolas de tal manera que cumplen un rol de almacenaje como también de transporte. Para la incorporación de la molécula se deben tener en cuenta ciertos factores como el tamaño de la molécula o sustancia y la cantidad que se espera liberar. Estos sistemas se basan en una liberación controlada, y su eficiencia está determinada por el tamaño de poros en el hidrogel como también la interacción fisicoquímica

entre el biomaterial con la sustancia a liberar, dado principalmente por enlaces covalentes, uniones electroestáticas e incluso asociaciones hidrófobas [23].

2.1.1.4 Según su estructura

Según su estructura los hidrogeles se clasifican en redes semi-interpenetradas y redes interpenetradas.

Hidrogeles de redes semi-interpenetradas: se forman mediante la polimerización y reticulación de un monómero en presencia de un polímero ya formado; de esta manera el polímero queda ocluido en la red tridimensional del hidrogel (Figura 3). Es un diseño utilizado para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, y para añadir ciertas propiedades del polímero en el material final [24].



Figura 3. Representación de redes semi-interpenetradas [24]

Hidrogeles de redes interpenetradas: consiste en una red polimérica entrecruzada covalentemente que posee en su interior otra red polimérica también entrecruzada mediante enlaces covalentes (Figura 4).



Figura 4. Representación de redes interpenetradas [24]

2.1.1.5 Según su sensibilidad a los diferentes estímulos

Este tipo de hidrogeles tiene su propia categoría debido a su singular comportamiento, ya que pueden cambiar algunas de sus propiedades mediante la aplicación de un estímulo específico, tal como un cambio en la temperatura, pH, campos eléctricos y luz. Estos cambios son revertidos una vez que el estímulo es removido [25]. Se pueden clasificar en hidrogeles que responden a estímulos físicos, químicos o bioquímicos. Entre los cambios físicos que pueden ocurrir se encuentran cambios de volumen o transiciones de fase sol-gel reversiblemente y se logran por cambios en la temperatura, cuando se aplican campos eléctricos o magnéticos, por exposición a la luz, etc., (Figura 5) [26].

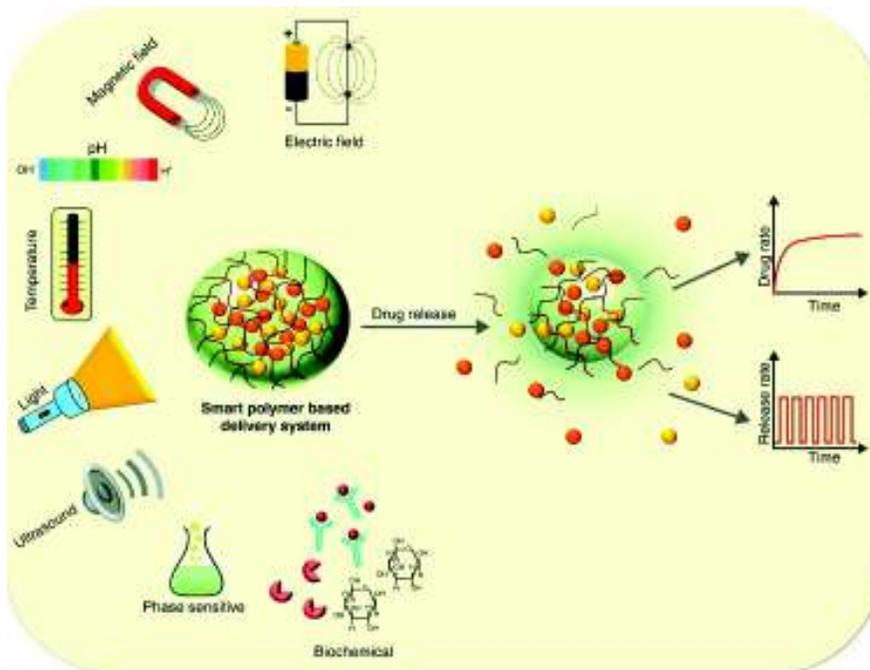


Figura 5. Hidrogeles sensibles a estímulos [27]

Un biopolímero con interesantes propiedades para su uso en la síntesis de hidrogeles es el poli(ácido- γ -glutámico).

2.2 Poli(ácido- γ -glutámico)

El Poli(ácido- γ -glutámico), es un polímero que dada su estructura química se puede considerar una poliamida. El enlace peptídico que se forma entre el grupo amino y el grupo carboxilo en posición γ es el origen de la denominación gamma. Es

producido en la naturaleza por una extensa variedad de bacterias, se puede sintetizar por vía química y a través de biosíntesis en el laboratorio. La excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad que presenta este biopolímero junto con el hecho de estar funcionalizado, le hacen atractivo para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de uso temporal. Sin embargo, las dificultades que entraña su modificación química, determinan que el grado de desarrollo tecnológico del γ -PGA sea aún incipiente [28].

2.2.1 Nomenclatura

La nomenclatura de la IUPAC poli(ácido- γ -glutámico), es poli[imino-1-(2-carboxietil)-2-oxo-1,2-etanodiilo] y su representación condensada o abreviada en base a la IUPAC y a la IUB(1971): poli(Glu), (Glu)_n, (PGGA). De manera común se le denomina poli(ácido- γ -glutámico) o γ -PGA.

2.2.2 Estructura Química

El Poli(ácido- γ -glutámico) es según su composición una homopoliamida, y según su estructura es un polímero lineal de condensación. Como su cadena principal está compuesta de átomos de carbono y además presenta átomos de oxígeno y nitrógeno en la misma se clasifica como un polímero orgánico no vinílico.

Según su naturaleza es un biopolímero ya que esta macromolécula es sintetizada por los seres vivos, en este caso bacterias. Es un material ópticamente activo puesto que tiene un centro quiral en cada unidad glutamato, tal y como se muestra en la Figura 6.

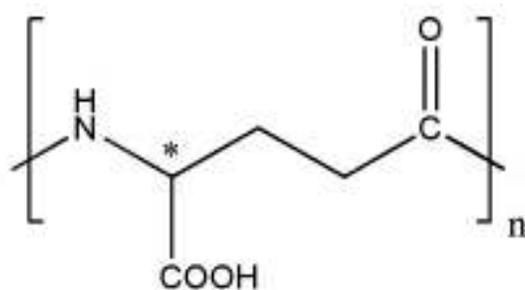


Figura 6. Estructura química del Poli(ácido- γ -glutámico)

Como resultado de su síntesis, el grupo carboxilo unido al carbono quiral puede encontrarse tanto en posiciones L como D, por lo que puede clasificarse como un polímero atáctico y amorfo. La conformación del γ -PGA en disolución es fuertemente dependiente de la concentración de polímero, pH, fuerza iónica y naturaleza de la sal añadida [29]. Este poliácido de $pK_a = 4-4.8$ [30], es un polímero de origen microbiano, biodegradable, biocompatible y que no resulta tóxico ni para el ser humano ni para el medioambiente [31,32, 33].

El poli(ácido- γ -glutámico) bacteriano es claramente diferente en estructura, en comparación con los poli(aminoácidos) convencionales unidos mediante el carbono α , por lo que podría ser mejor clasificado como un pseudo poli(aminoácido) [34]. Sus propiedades mecánicas y térmicas son pobres por lo que se busca mejorarlas mediante su funcionalización o creación de sistemas compuestos con otros polímeros. El γ -PGA se degrada rápidamente con agua a temperaturas por encima de 60°C ; a temperaturas por debajo de 60°C la velocidad de degradación disminuye notablemente pero sigue siendo importante [35].

2.2.3 Biosíntesis

Las bacterias productoras de PGA se dividen en dos categorías: bacterias dependientes del ácido L-glutámico y bacterias independientes del ácido L-glutámico [36]. En las bacterias independientes del ácido L-glutámico, todo el ácido glutámico requerido para producir γ -PGA se genera a partir de una fuente de carbono a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 7). Estas cepas producen ácido L-glutámico a partir del ácido cítrico por medio del ácido isocítrico y el ácido 2-oxoglutámico con la ayuda de la glutamato deshidrogenasa (GDH). Parte del ácido L-glutámico se convierte en el isómero D a través de la acción de la glutamato racemasa. También funciona una vía de conversión indirecta a través de L- y D-Alanina. Las unidades de ácido L / D-glutámico en el citoplasma se mueven a la membrana celular donde la sintetasa γ -PGA (Pgs) integrada en la membrana las ensambla en γ -PGA. En cepas dependientes del ácido L-glutámico, una vez ingerido este, el ácido L-glutámico se convierte parcialmente en ácido D-glutámico.

La síntesis de γ -PGA a partir de los monómeros utiliza la misma ruta biosintética que en los productores independientes de ácido glutámico [37].

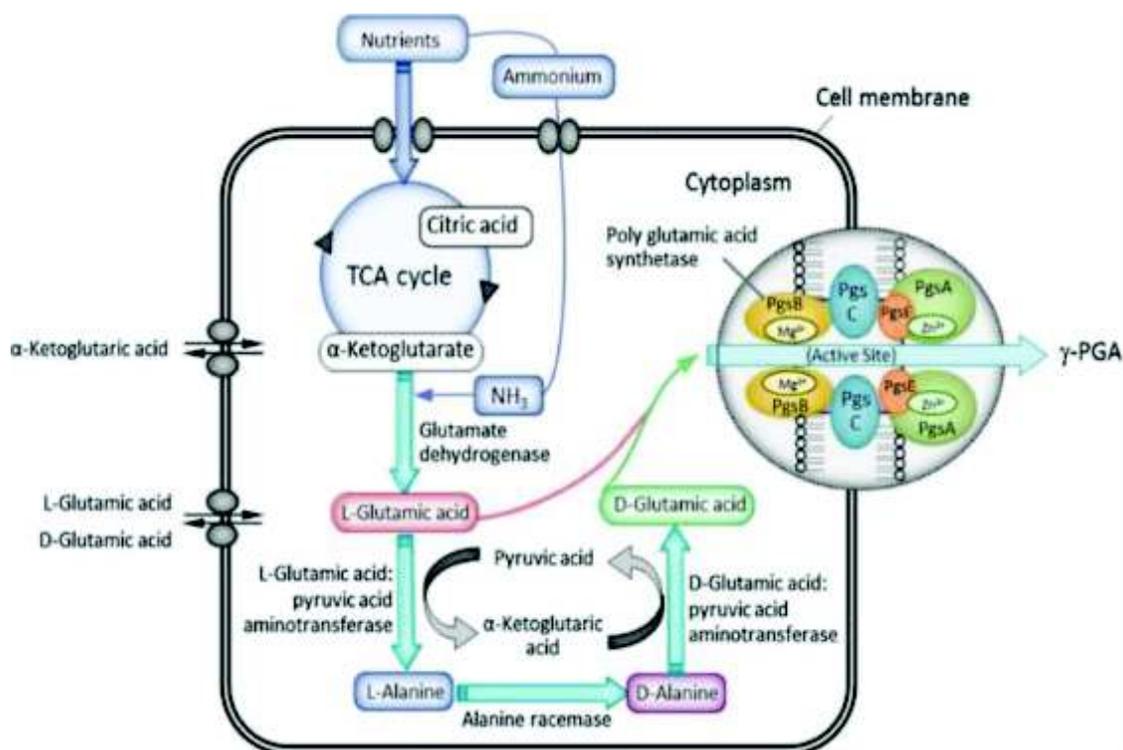


Figura 7. Ruta biosintética del γ -PGA en especies *Bacillus* dependientes e independientes del ácido L-glutámico, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) [36]

2.2.4 Aplicaciones

La mayor parte de las aplicaciones actuales del γ -PGA se sitúan en el sector de la alimentación. Los desarrollos como material floculante y gelificante están muy avanzados. La posibilidad de emplear γ -PGA en aplicaciones biomédicas ha sido estudiada por diferentes autores [38]. El Poli(ácido glutámico) es soluble en agua, biodegradable, comestible y no tóxico [39]. Por ello el γ -PGA ha generado un interés creciente tanto a nivel de investigación como industrial. Su uso se ha estudiado en áreas tales como el transporte y liberación de fármacos o los bioadhesivos [40]. La capacidad del γ -PGA como dispensador de fármacos y proteínas ha sido investigada por diversos autores [41]. Se ha probado en particular en la ovoalbúmina

encapsulada en nanoesferas de γ -PGA, teniendo una aplicación potencial en la liberación de vacunas [42].

El γ -PGA además puede aplicarse como agente inmuno estimulante y antitumoral especialmente en el caso del polímero de elevado peso molecular [43]. En inmunoterapia anticáncer se han utilizado nanopartículas de γ -PGA como portadoras de antígenos, comprobándose que se incrementa la respuesta inmune [44].

2.3 Aplicaciones de los hidrogeles

Los hidrogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en medicina dada su buena interacción con los tejidos vivos [45,46], ya que por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua [47,48]. Por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a pegarse a su superficie [49]. Y además, su característica de hinchamiento en medio líquido les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas, algunas soluciones orgánicas [50].

En la aplicación como liberadores de medicamentos, los hidrogeles han sido ampliamente usados como portadores inteligentes de sustancias activas [51, 52], y sus características físicas y químicas tales como capacidad de hinchamiento, cinética de liberación, respuesta al ambiente o biodegradabilidad, han sido trabajadas por la ingeniería hasta niveles moleculares con el fin de lograr su optimización [53]. La capacidad de absorción de agua, determinada por el estado de equilibrio de hinchamiento, se debe al balance que ocurre entre las fuerzas osmóticas, debidas al agua que entra en la red, y las fuerzas que ejercen las cadenas poliméricas en oposición a esa expansión. El proceso de obtención del hidrogel determina la capacidad de hinchamiento que este tendrá, dado que los espacios que se establezcan entre las redes poliméricas flexibles que se formen en dicho proceso determinará la cantidad de agua que el hidrogel pueda albergar. Esta flexibilidad a su vez se ha mostrado que es función de: el peso molecular, el grado

de pureza del polímero y de su concentración en solución acuosa, además de factores propios del método físico o químico de síntesis [54].

2.3.1 Liberación controlada de fármacos

Esta tecnología es relativamente nueva. Con los métodos tradicionales de liberación de medicamentos se obtienen controles muy pobres sobre los niveles de fármaco óptimos terapéuticos que demandan los tratamientos debido a las fluctuaciones de concentraciones plasmáticas de medicamento. Estas imprecisiones provocan que el medicamento, que en principio puede ser efectivo para tratar la enfermedad, no se administre ni en la cantidad, ni el tiempo, ni el lugar esperado para que el tratamiento sea eficaz [55]. Como solución, han surgido sistemas de liberación controlada que mantienen la concentración del medicamento en un rango terapéutico por tiempo prolongado (Figura 8).

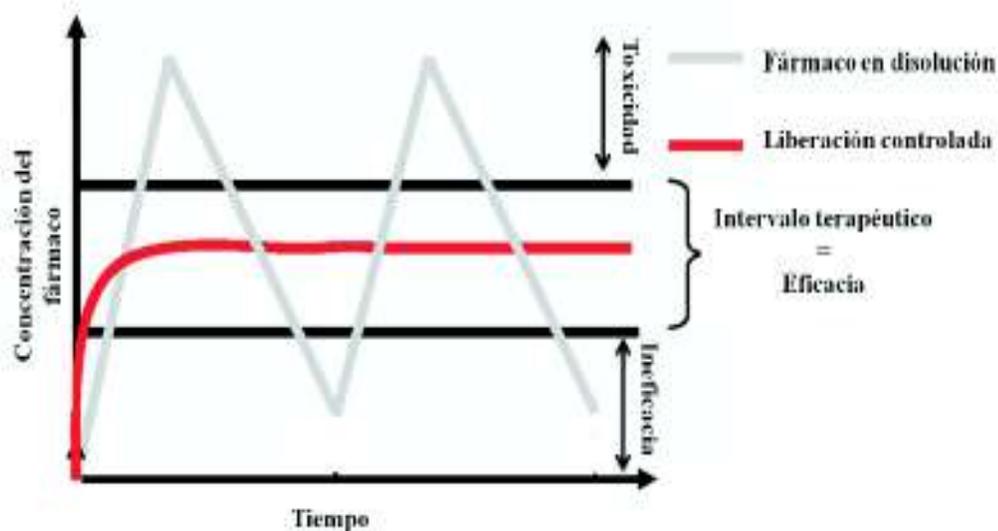


Figura 8. Representación de las concentraciones plasmáticas en sistemas de liberación convencional (---) y controlada (-.-) [24]

Por otro lado, el avance creciente en los últimos años sobre hidrogeles con facultades en la liberación de fármacos trae nuevas alternativas para que un control preciso pueda ser aplicado en la administración de medicamentos. Su fundamento

reside en que una determinada fracción liberada de fármaco provoca una acción farmacológica específica [56]. Se ha demostrado que existe una relación directa entre la porción de fármaco liberada y su acción farmacológica. Así, cuando se desea un efecto en particular el grado de liberación debe ser controlado en un entorno muy específico, ya que dosis más elevadas pueden producir efectos farmacológicos no deseados además de la acción terapéutica [57].

2.4 Sulfato de neomicina

El sulfato de neomicina es un antibiótico aminoglucósido bactericida de amplio espectro que actúa por inhibición de la síntesis proteica de la bacteria mediante enlace con la subunidad 30S ribosomal. Es un compuesto de naturaleza básica, térmicamente estable y conserva su eficacia en solución acuosa en comparación con otros antibióticos [58]. Es producido por *Streptomyces fradiae*, y se administra por vía oral y tópica siendo esta última su mayor aplicación como medicamento antiinfeccioso. Se utiliza para uso cutáneo, sola o en combinación con corticoides y/o otros antibióticos. El uso clínico más frecuente es la aplicación tópica para el tratamiento de infecciones dermatológicas, oftalmológicas y otológicas. El ungüento dérmico se utiliza en la prevención de infecciones cutáneas bacterianas leves, tratamiento de úlcera dérmica e infecciones secundarias por quemaduras, aplicándose de una a tres veces al día en adultos. La principal ventaja de su uso es que es un medicamento activo frente a la gran mayoría de bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas aeróbicas [59]. La estructura química del sulfato de neomicina se muestra en la Figura 9.

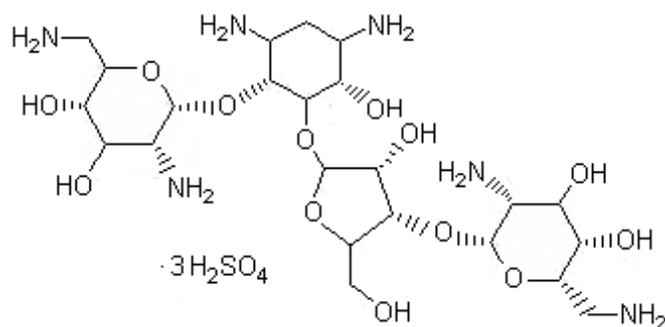


Figura 9. Estructura química del sulfato de neomicina

2.5 Aplicación de modelos matemáticos en los sistemas de liberación controlada de fármacos

Estudiar la cinética de liberación de un fármaco que se encuentra cargado en una matriz polimérica es de vital importancia para el desarrollo de sistemas de liberación controlada, porque permite calcular constantes que brindan información útil vinculada al mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación. Desde esta perspectiva, es necesario elegir un modelo matemático adecuado que ajuste los datos obtenidos en el perfil de liberación de dicho sistema. Lo recomendable es evaluar varios modelos matemáticos que representen diferentes procesos de liberación para posteriormente interpretar las variables o constantes que se describen en estos modelos teniendo en cuenta el coeficiente de regresión obtenido en cada ajuste.

La liberación de un fármaco en una matriz polimérica puede darse mediante varios mecanismos: difusión y relajación o hinchamiento de las cadenas poliméricas. La difusión tiene lugar cuando el fármaco atraviesa la matriz estimulado por el gradiente de concentración que existe en el sistema y el medio circundante. En los sistemas controlados por difusión el dispositivo de entrega del fármaco es fundamentalmente estable en el ambiente biológico y no cambia su tamaño [60].

Si el proceso de liberación ocurre controlado por el hinchamiento, la matriz polimérica que inicialmente se encuentra en estado cristalino sufre una transición vítrea y se forma un hidrogel. En este proceso ocurre la difusión del fármaco desde el interior de la matriz hacia el medio mientras que el agua o el fluido biológico pasa al interior de la matriz [61].

La cinética de liberación del fármaco, incluida la velocidad de difusión, depende de las propiedades físicas del mismo, especialmente de su peso molecular y de su solubilidad en agua y en el hidrogel, además del área superficial, la geometría y la densidad de la membrana del hidrogel [62].

Como es de esperarse, en el proceso de liberación de fármacos disueltos o encapsulados en un polímero hacia el medio externo, éstos deben atravesar la barrera que supone la superficie del hidrogel, por lo cual las condiciones de

estructura y forma de la superficie son un factor importante en la liberación. Este factor también se puede controlar desde la síntesis de la red polimérica e incluye el control del tamaño del poro [63].

2.5.1 Modelo de orden cero

Es un modelo ampliamente utilizado para sistemas de dosificación que no se desagregan haciendo muy lenta la liberación del fármaco. Para este modelo, se asume que el área de la tableta no cambia considerablemente. Este es expresado a partir de la siguiente ecuación (1):

$$M_t = M_0 + k_0 t \quad (1)$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelto en el tiempo t , M_0 es la cantidad de fármaco inicial en la solución (la mayoría de las veces $M_0 = 0$) y k_0 corresponde a la constante de liberación de orden cero [64].

2.5.2 Modelo de Higuchi

Este modelo se basa en la hipótesis de que la difusión del fármaco se lleva a cabo en una sola dimensión; que la disolución y el hinchamiento de la matriz son despreciables; que la difusividad del fármaco es constante, y que, en el medio de disolución, siempre se alcanzan condiciones perfectas de inmersión. Es ampliamente utilizado para describir la liberación de fármacos solubles y poco solubles en medios acuosos, desde diversas matrices semi – sólidas y/o sólidas de acuerdo a la ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{1/2} \quad (2)$$

Donde k_H es la constante de disolución de Higuchi, M_∞ es la cantidad de fármaco liberada en el equilibrio, mientras que M_t , y t corresponden a los mismos parámetros anteriormente descritos.

2.5.3 Modelo de Korsmeyer-Pepas

Es un modelo generalizado de la ecuación de Higuchi. Ha sido ampliamente usado para describir la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos. La ecuación relacionada es:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_r t^n \quad (3)$$

Donde M_t/M_∞ corresponde a la fracción de fármaco liberado al tiempo t ; k_r es la constante de liberación que es característica para las interacciones polímero-fármaco, mientras que n es igual al exponente de difusión que es característico del mecanismo de liberación. En el caso de que la liberación se produzca desde una película delgada, un valor de n igual a 0.5, indica que el mecanismo de liberación del fármaco es de tipo fickiano; valores entre 0.5 y 1 indican un mecanismo de liberación no fickiano, mientras que n igual a 1, sugiere que el mecanismo es similar a una cinética de liberación de orden cero. Para valores mayores a 1, la liberación del fármaco depende de la relajación de las cadenas poliméricas en la matriz, que pasan de un estado vítreo a uno gomoso de mayor movimiento cinético. La determinación del exponente n se debe realizar con el 60% del fármaco disuelto [65].

2.6 Técnicas de caracterización

2.6.1 Espectroscopia Infrarroja. Aspectos fundamentales

La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10 \text{ cm}^{-1}$. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano: $12800-4000 \text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000-400 \text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400-10 \text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales. Cuando una molécula absorbe radiación en esta zona del espectro electromagnético, la energía de estas vibraciones moleculares puede detectarse y medirse obteniendo un espectro infrarrojo. Por tanto, este tipo de espectroscopia considera las transiciones entre diferentes niveles vibracionales de una molécula. A estas transiciones, les acompañan otras de menor energía, que son las rotacionales, que hacen que en un espectro vibracional las diferentes

absorciones se detecten en forma de bandas más ensanchadas, en lugar de líneas, ya que un cambio energético entre dos niveles vibracionales está acompañado por un gran número de transiciones rotacionales [66].

Las absorciones vibracionales de infrarrojo, están sometidas a unas reglas de selección. Para que una molécula (o grupo o enlace) absorba o emita en la zona del infrarrojo, es necesario que el modo de vibración normal produzca una variación de su momento dipolar, es decir, debe producirse un desplazamiento temporal del centro de gravedad eléctrico, se dice entonces que es un modo activo en IR. La mayor parte de las moléculas orgánicas son asimétricas o su simetría es muy reducida, por lo que la mayoría de sus enlaces dan lugar a bandas de absorción en el espectro infrarrojo. La intensidad de las bandas del espectro infrarrojo, va a depender en gran medida de la variación del momento bipolar. Cuanto mayor sea esta variación, mayor será la intensidad de la banda. En la Figura 10 se muestran las frecuencias vibracionales de los principales enlaces presentes en compuestos orgánicos [67].

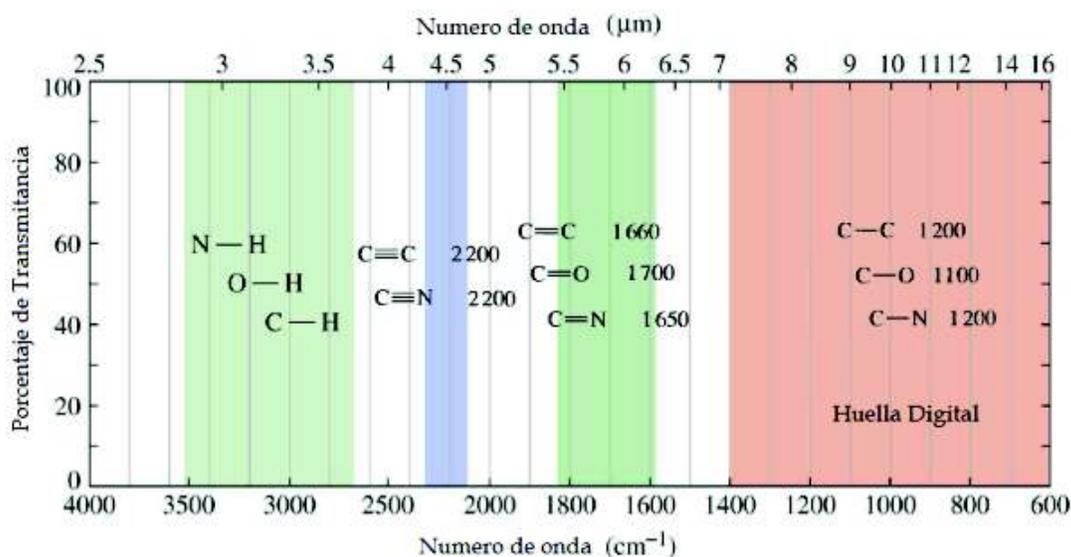


Figura 10. Frecuencias vibracionales para algunos enlaces [65]

Utilizando la mecánica cuántica y el modelo del oscilador armónico para representar los enlaces, se demuestra que las bandas en el infrarrojo se producen como

consecuencia de transiciones entre niveles de energía en los que el número cuántico vibracional (ν) cambia en una unidad ($\Delta \nu = \pm 1$), denominada banda fundamental, o en más de una unidad ($\Delta \nu = \pm 2, \pm 3, \dots$), que se denominan sobretonos. Aunque teóricamente son posibles $\Delta \nu$ superiores, en la práctica sólo se observan estas tres transiciones. Una molécula poliatómica (n átomos) tiene $3n-6$ modos de vibración diferentes y $3n-5$ si la molécula es lineal. Cada uno de estos modos de vibración viene representado por una curva de energía potencial diferente y da lugar a una banda fundamental y sus correspondientes sobretonos en el infrarrojo. Las bandas de absorción aparecen aproximadamente a frecuencias: ν (la banda fundamental), 2ν y 3ν (los sobretonos). Estos últimos tienen una menor intensidad que la banda fundamental [68].

Los espectrofotómetros convencionales de IR tienen un sistema óptico formado por una fuente de luz que es un filamento que se mantiene “al rojo”, componentes ópticos hechos de KBr o NaCl (materiales que no absorben la radiación IR) y un fotodetector que es sensible a la luz IR. Los espectrofotómetros infrarrojos más modernos son del tipo de transformada de Fourier (FTIR), que se basan en el principio del interferómetro de Michelson, Su funcionamiento se basa en la división de un haz coherente de luz en dos haces para que recorran caminos diferentes y luego converjan nuevamente en un punto. De esta forma se obtiene lo que se denomina la “figura” de interferencia que permitirá medir pequeñas variaciones en cada uno de los caminos seguidos por los haces. En la Figura 11 se muestra un esquema del sistema óptico de un espectrofotómetro FTIR cuyo componente esencial es un interferómetro de Michelson que está formado por un divisor de haz y dos espejos, uno fijo y otro móvil. Cuando la luz colimada procedente de la fuente incide sobre el divisor de haz se divide en dos rayos que se reflejan en cada uno de los espejos y vuelven al divisor de haz, siendo conducidos por un sistema de espejos hasta el detector a través de la muestra [69].

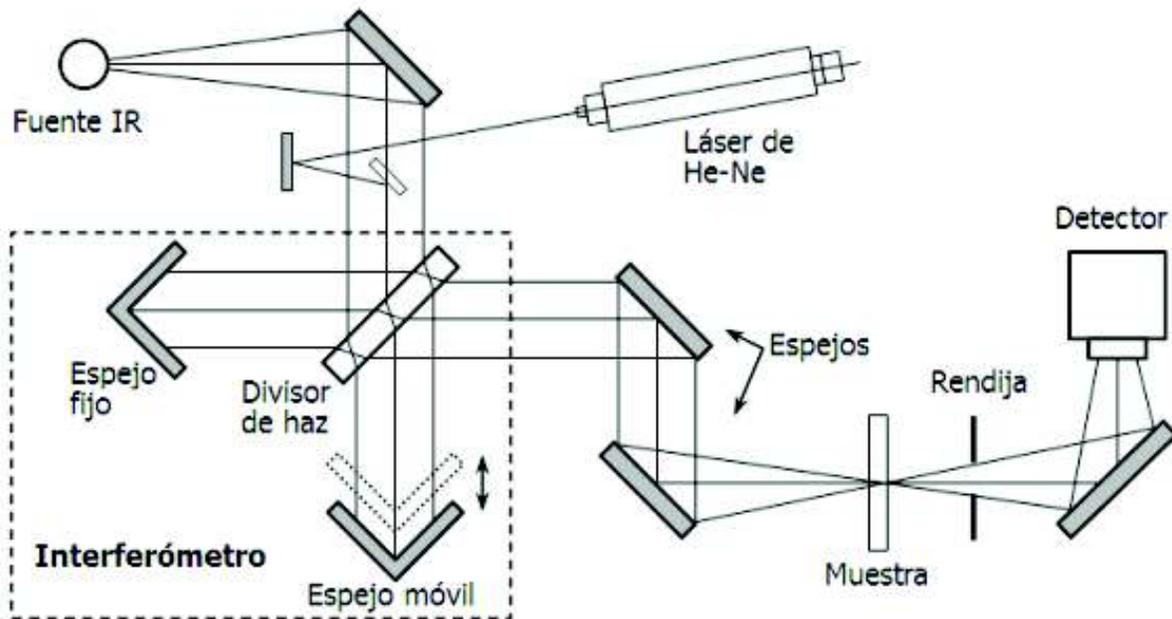


Figura 11. Esquema de un sistema óptico de un espectrofotómetro FTIR [68]

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que se utiliza para obtener un espectro infrarrojo de absorción, emisión, fotoconductividad o dispersión Raman de un sólido, líquido o gas. Un espectrómetro FTIR simultáneamente recoge los datos espectrales en un amplio rango espectral. Esto confiere una ventaja significativa sobre un espectrómetro dispersivo que mide la intensidad en un intervalo estrecho de longitudes de onda a la vez. En FTIR la salida analógica del detector es amplificada y transformada en una señal digital. Este interferograma digital se trata numéricamente, mediante una transformación de Fourier, para dar lugar al espectro. El término espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier es originario del hecho de que una transformada de Fourier (un algoritmo matemático) se requiere para convertir los datos en bruto en el espectro real. La ventaja fundamental de la técnica FTIR frente al IR dispersivo convencional, es la rapidez en la adquisición del espectro debido a que se adquieren simultáneamente todas las componentes de frecuencia del espectro, lo que permite acumular un gran número de espectros en poco tiempo, con la consiguiente mejora en la relación señal/ruido. Esto es especialmente importante en las regiones del espectro infrarrojo en que la fuente tiene una emisión débil y/o el detector es poco sensible [70].

2.6.1.1 Reflectancia Atenuada Total

La Reflectancia Atenuada Total, (ATR, *Attenuated Total Reflectance*), es una técnica de muestreo utilizada en conjunción con la espectroscopia infrarroja que permite examinar directamente muestras en cualquier estado de agregación sin ningún tipo de preparación previa, poniéndolas en contacto con un material de alto índice de refracción, siempre más alto que el de la muestra estudiada. El ATR utiliza la propiedad de la reflexión total interna (reflectancia interna) de los materiales con un alto índice de refracción que resulta al incidir una onda, en este caso un haz infrarrojo, sobre el mismo. El diamante es con mucho, el mejor material/cristal para utilizar en ATR debido a su durabilidad y por ser inerte, siendo el componente “estrella” de este tipo de aparatos. El fundamento de los ATR (Figura 12) de diamante es sencillo, un haz de luz infrarroja con un cierto ángulo se hace incidir sobre un prisma de diamante en contacto directo con la muestra objeto de estudio [71].

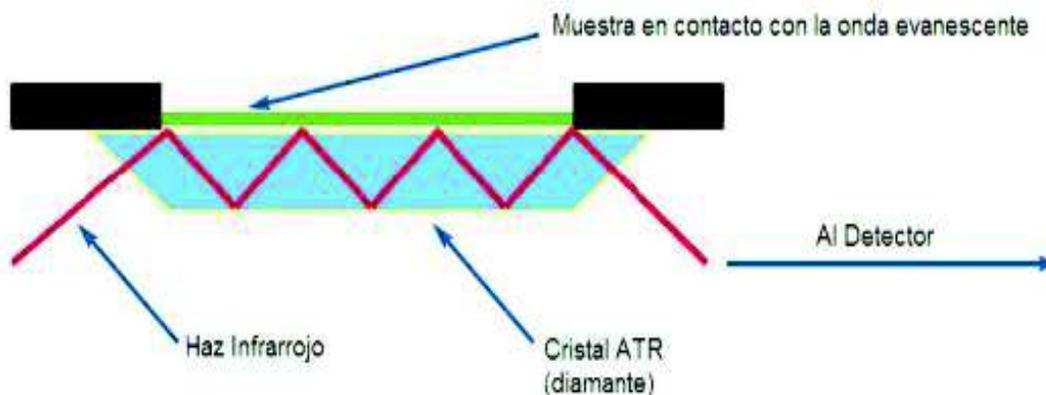


Figura12. Fundamento de la técnica de ATR [70]

En las regiones del espectro infrarrojo, donde la muestra absorba energía, la onda evanescente será atenuada o alterada. Toda esta señal es dirigida hacia el extremo opuesto del cristal y es pasada al detector del espectrómetro. El sistema genera entonces un espectro infrarrojo [66].

2.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido

El fundamento de la microscopía electrónica de barrido, SEM, radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío alrededor de 10^{-7} Torr. En ella el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas que producen una disminución de su diámetro hasta hacerse casi puntual (hasta unos 10 nm). Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos 10^{-14} A hasta unos 10^{-10} A. Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios. El haz de electrones con estas últimas características, es decir en forma puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que va barriendo la muestra con continuas idas y venidas [72]. Los componentes de un microscopio electrónico se muestran en la Figura 13.

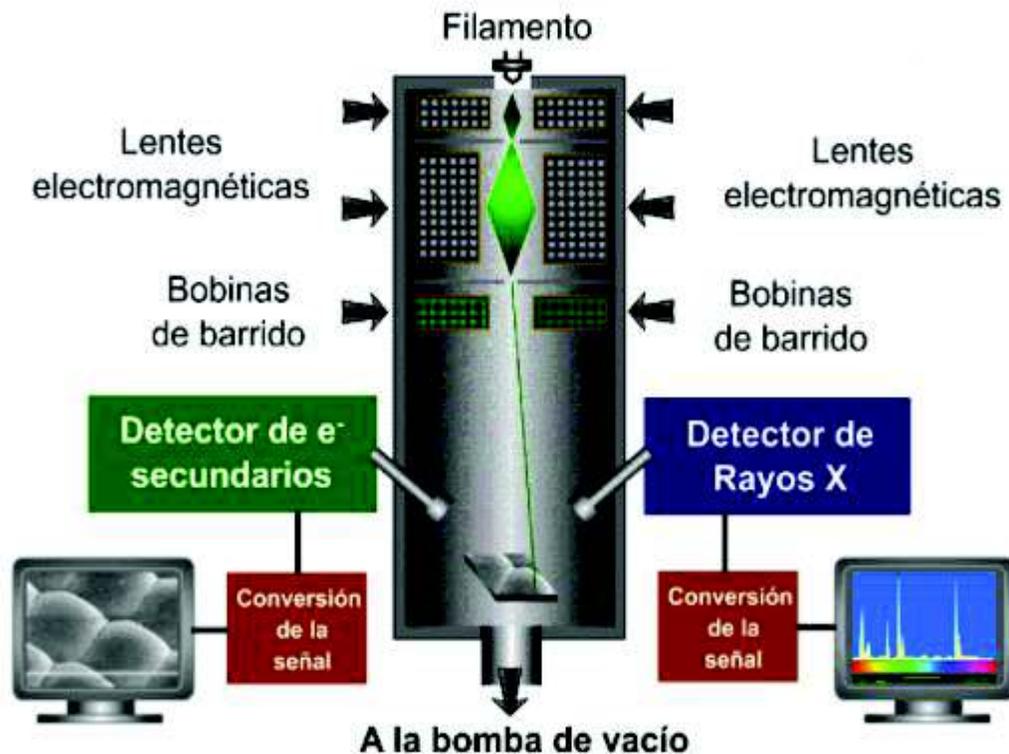


Figura 13. Componentes del microscopio electrónico [71]

Las imágenes que se obtienen en el microscopio electrónico de barrido corresponden a electrones secundarios o electrones retrodispersados emitidos tras

la interacción con la muestra del haz incidente de entre 5 y 30 KeV. El haz de electrones se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y de tal modo que la posición en la que se encuentra el haz en cada momento coincide con la aparición de brillo, proporcionalmente a la señal emitida, en un determinado punto de la pantalla [73].

La señal de electrones secundarios se forma en una delgada capa superficial, del orden de 50 a 100 Å. Son electrones de baja energía, menos de 50 eV, que pueden ser desviados fácilmente de su trayectoria emergente inicial y permiten obtener información de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad otorga a esta señal la posibilidad de aportar información “en relieve”. La emisión de electrones retrodispersados depende fuertemente del número atómico de la muestra. Esto implica que dos partes de la muestra que tengan distinta composición se revelan con distinta intensidad aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas. Los rayos X que se generan en una muestra sometida a bombardeo electrónico permiten identificar los elementos presentes y establecer su concentración [67,68].

2.6.2.1 Ventajas de la microscopía electrónica

La microscopía electrónica es una técnica muy útil en la caracterización de materiales ya que se necesita muy poca cantidad de muestra y se trata de una técnica no destructiva (mientras no haya que cortar la muestra para que quepa en el portaobjetos o recubrir), es decir, la muestra no se ve perjudicada y se puede recuperar. El único requisito que implica la utilización de esta tecnología es que la muestra debe ser conductora, ya que la obtención de la imagen es producto de la interacción de los electrones emitidos por el equipo y la muestra. Si nuestra muestra no es conductora, se pueden utilizar equipos que depositan por medio de deposición física de vapor, una capa de pocos nanómetros de un elemento conductor sobre la muestra, permitiendo de esta forma la obtención de imágenes por microscopía electrónica de barrido y composición a través de EDX. Las imágenes que se obtienen tienen una gran resolución [74].

Tanto la parte más puramente de imagen como su detector EDX son técnicas no destructivas y de respuesta rápida, por lo que son consideradas potentes herramientas en la caracterización de todo tipo de materiales, ya que nos permiten conocer qué tipo de topología superficial tiene nuestra muestra, sus defectos y su composición con la obtención de una sola imagen [69].

2.6.3 Análisis Térmico

El análisis térmico es un conjunto de técnicas analíticas que estudian el comportamiento térmico de los materiales. Cuando un material se calienta o se enfría, su estructura y su composición química pueden sufrir cambios tales como fusión, sublimación, solidificación, cristalización, descomposición, oxidación térmica o sinterización. En general estos cambios se pueden estudiar midiendo la variación de distintas propiedades de la materia en función de la temperatura, el tiempo y una atmósfera determinada. De entre las diversas técnicas que se engloban en este campo analítico, las más ampliamente utilizadas son: Termogravimetría (TG) y Análisis térmico diferencial (DTA) [75].

2.6.3.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico es una técnica de caracterización en la que el peso de una sustancia, con calentamiento o enfriamiento a velocidad controlada, es registrado de manera continua en función del tiempo o de la temperatura. En el primer caso (experimento isotérmico), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento, y en el segundo (experimento dinámico) la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (usualmente de forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. La pérdida de masa de un material puede ser causada reacciones de descomposición, reacciones de oxidación, vaporización, sublimación y/o desorción. [76].

El equipo cuenta con: 1) termobalanza; 2) horno; 3) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte y 4) un procesador para el control del

instrumento, la adquisición y visualización de datos. La medida del cambio de masa en función de la temperatura se realiza en la termobalanza (Figura 14) [77].

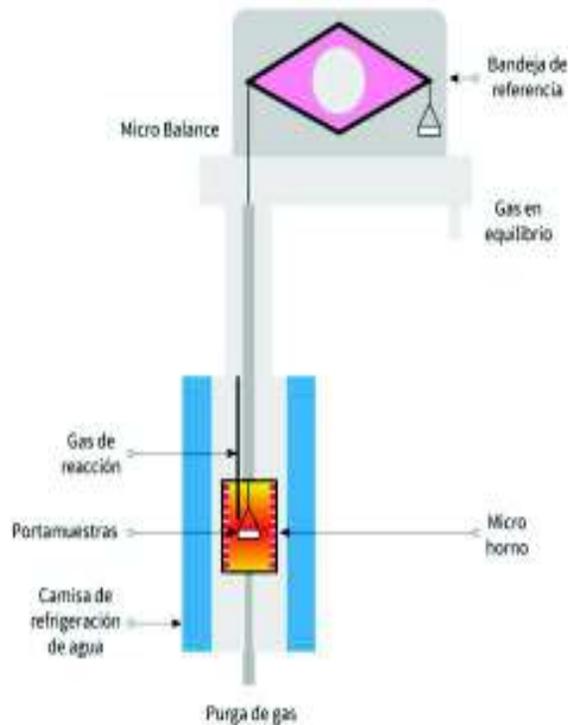


Figura14. Representación de un termobalanzador [77]

2.7 Biocompatibilidad

Las interacciones del biomaterial con los componentes vivos tienen un impacto significativo en la habilidad del material para desarrollar satisfactoriamente y en el tiempo necesario, la función deseada. La característica esencial que deben poseer los biomateriales para ser empleados en el campo de la biomedicina, es la biocompatibilidad con los tejidos es decir que sea compatible en contacto con la zona biológica y que el organismo no desencadene una respuesta inmunológica contra el biomaterial, además de poseer la resistencia y propiedades mecánicas adecuadas dependiendo de su uso [78] .

La definición más aceptada de biocompatibilidad se refiere a la característica del biomaterial de tener la habilidad de desarrollar su función con una respuesta favorable del huésped hacia él mismo en una aplicación delimitada. En concreto la

biocompatibilidad se refiere a la capacidad del tejido de permitir el contacto con el biomaterial existiendo una respuesta favorable del huésped hacia el mismo, aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida [79].

Todo ensayo de biocompatibilidad de un nuevo biomaterial debe ser realizado *in vitro* antes que *in vivo* con la finalidad de disminuir el uso de los modelos animales y los riesgos en las pruebas clínicas. Los fibroblastos, como células dérmicas que se encuentran principalmente en la capa basal de la piel, son las células utilizadas para determinar la citocompatibilidad *in vitro* de diversos hidrogeles, al medir su proliferación e interacción con la finalidad de apreciar el panorama general de sus funciones normales. Los estudios de biocompatibilidad *in vitro* pueden mostrar incluso la dosis y duración del tratamiento en medida que reflejan las respuestas celulares y moleculares de las células hacia los biomateriales evaluados [80].

2.7.1 Citotoxicidad

La toxicidad celular o citotoxicidad se define como los efectos adversos que resultan de la interferencia con estructura, procesos celulares, o ambos, que se suceden en todas las células y son esenciales para el funcionamiento, supervivencia y proliferación celular [81].

Los ensayos de citotoxicidad se utilizan para medir los efectos de compuestos tóxicos expuestos a cultivos celulares, en múltiples concentraciones y en diferentes intervalos de tiempo. La citotoxicidad y la proliferación celular se evalúan por varios ensayos. Entre los métodos más empleados están la reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio bromuro), que requiere de células vivas, o que, al menos, muestren actividad óxido-reductasa, para convertir el colorante precursor en un producto cuantificable, y la tinción con sulforodamina B (SRB) que, por su afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, se fija selectivamente en éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular [82].

Al igual que los métodos anteriormente mencionados, la resazurina fue introducida como indicador de viabilidad celular no tóxica, útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad. En particular, este colorante (azul no fluorescente) se reduce irreversiblemente a resorufina (rosado altamente fluorescente), proceso que se asocia principalmente con la mitocondria de células viables y se representa en la Figura 15. Cuando hay una reducción en la viabilidad celular de más del 30%, se considera que hay efectos citotóxicos [83].

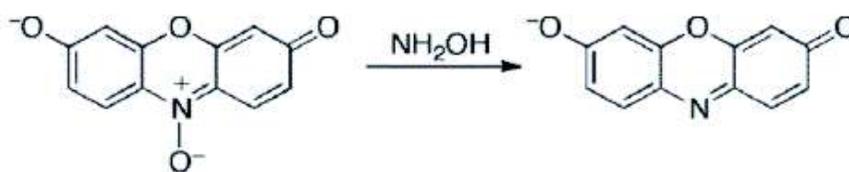


Figura 15. Reducción de resazurina a resorufina

3. Desarrollo Experimental

3.1 Reactivos

- γ -PGA crudo (sintetizado en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA))
- Urea (99.4%, FAGA LAB.)
- N-(3-Dimetiliminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorohidrato [EDC] ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) Alcohol etílico absoluto (99.91%, FAGA LAB.)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.8%, J. T. Baker)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (98-102%, FAGA LAB.)
- K_2HPO_4 (98%, FAGA LAB.)
- NaCl ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)
- KCl (99.63%, FAGA LAB.)
- Na_2CO_3 anhidro (99%, FAGA LAB.)
- Agua (calidad MiliQ)

3.2 Síntesis de hidrogeles de poli(ácido γ -glutámico)

En un vaso de precipitado de 10 mL se añadieron 0.4g de γ -PGA y 2 mL de agua desionizada. Posteriormente se agitó a 300 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez disuelto el polímero, la disolución se congeló y liofilizó para obtener esponjas de γ -PGA. Enseguida se le adicionaron 0.12 g ($2 \cdot 10^{-3}$ moles) de urea y 0.2 g ($1.3 \cdot 10^{-3}$ moles) de EDC disueltos en 1 mL de agua. Se dejaron reposar durante 24 horas y pasado este tiempo se realizaron lavados de EtOH, EtOH:H₂O, H₂O. Finalmente se congelaron y liofilizaron para obtener el xerogel. El procedimiento se muestra en el siguiente diagrama de flujo (Figura 16).

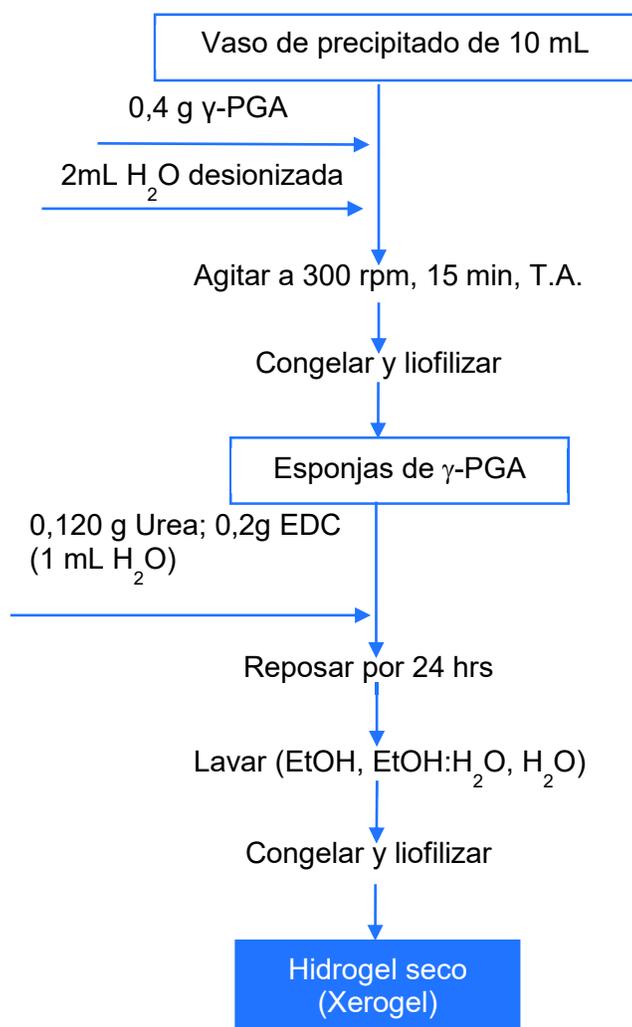


Figura 16. Diagrama de flujo “Síntesis de hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico)”

Una vez sintetizados los hidrogeles se procedió a incorporar en la matriz polimérica al sulfato de neomicina.

3.3 Incorporación del sulfato de neomicina a la matriz polimérica

3.3.1 Preparación de la curva de calibración para la medición de la concentración de neomicina

Para la obtención de la curva de calibración del sulfato de neomicina, se prepararon soluciones estándar del fármaco en un rango de concentraciones de 0.025 - 0.150 mg/mL y se midió la absorbancia de estas soluciones a 220 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Agilent 8453. Posteriormente se graficó la concentración de la solución estándar frente a las lecturas de absorbancias de las mismas y se ajustaron los valores a una relación lineal como se muestra a continuación en la Figura 17

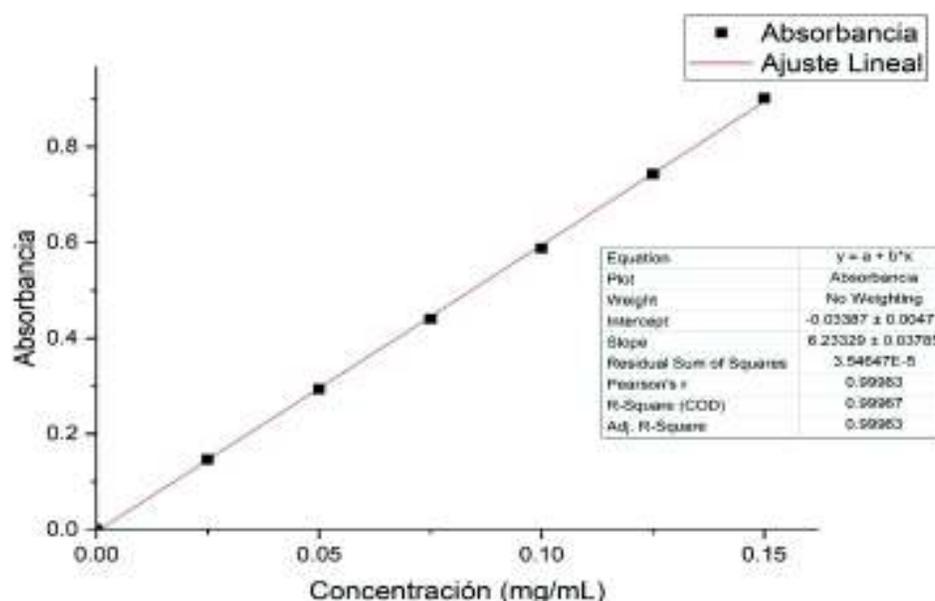


Figura 17. Curva de calibración del sulfato de neomicina

3.3.2 Cargado del sulfato de neomicina en los hidrogeles

La carga del sulfato de neomicina en los hidrogeles se llevó a cabo mediante el método de equilibrio de hinchamiento. Se sumergieron muestras cilíndricas de hidrogeles de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor en 1 mL de la solución del fármaco empleado con una concentración de 20 mg/mL (Figura 18). Las muestras de hidrogel se mantuvieron durante 24 horas en la solución de sulfato de neomicina

a 25°C para alcanzar el máximo hinchamiento y la carga en equilibrio del medicamento, después de lo cual las muestras se congelaron y secaron por el método de liofilización. La solución del fármaco fue absorbida en su totalidad por lo cual los hidrogeles fueron cargados con lo que equivale a la dosis diaria del medicamento en adultos (20 mg).



Figura 18. Hidrogeles cargados con sulfato de neomicina

3.4 Caracterización de los hidrogeles cargados con sulfato de neomicina

Los hidrogeles cargados con sulfato de neomicina fueron caracterizados por las técnicas que se describen a continuación.

3.4.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) fueron obtenidos empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Frontier. El espectro del sulfato de neomicina fue realizado utilizando una pastilla de bromuro de potasio (KBr), mientras que para la caracterización del poli(ácido- γ -glutámico) y de los hidrogeles secos cargados con sulfato de neomicina se empleó la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Este estudio se hizo con la finalidad de identificar los grupos funcionales en el polímero y del sulfato de neomicina así como verificar que esta última se encuentra formando parte de los hidrogeles.

3.4.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Para el análisis termogravimétrico de los hidrogeles cargados con neomicina se utilizó un equipo Thermogravimetric Analyzer, marca Perkin Elmer, modelo Pyris 1. Se emplearon muestras de aproximadamente 2.5 mg, y fueron sometidas a calentamiento de 25°C a 900°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno.

3.4.3 Microscopía Electrónica de Barrido.

Se realizó la caracterización morfológica de los hidrogeles mediante un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL 5410LV. Las muestras se recubrieron con oro para conferirles propiedades conductoras y se utilizó un haz de electrones de 15 kV de intensidad.

3.5 Ensayos *in vitro* de liberación de sulfato de neomicina

3.5.1 Preparación de soluciones buffer

Para los experimentos de cinética de liberación se prepararon soluciones tampón a pH 5, pH 7.4 y pH 9, las metodologías empleadas para prepararlas se describen a continuación:

- Buffer de pH 5

La solución tampón de pH 5 se preparó mezclando 467.7 mL de una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [0.2M] y 32.5 mL de una disolución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ [0.2M]. Posteriormente se añadió agua desionizada hasta completar 1 L.

- Buffer de pH 7.4

Esta solución tampón se preparó mezclando 95 mL de una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [0.2M] y 405 mL de una disolución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ [0.2M]. Seguidamente se añadió agua desionizada hasta completar 1 L

- Buffer de pH 9

Para la preparación de esta solución tampón a pH básico se empleó un buffer de carbonatos y para ello se tomaron 76.8 mL de una solución de bicarbonato de sodio

NaHCO₃ [0.1M] y se le añadieron 7.7 de una solución de carbonato de sodio anhidro Na₂CO₃ [0.1M]. Finalmente se añadió agua desionizada hasta completar 1 L.

3.5.2 Evaluación del efecto del pH y de la temperatura sobre la cinética de liberación

Para la realización de los ensayos de liberación, las muestras de hidrogeles de 10 mm de diámetro se sumergieron en 150 mL de solución buffer y se colocaron en un baño María con agitación mecánica y a una temperatura establecida, como se muestra en la Figura 19. Cada 10 minutos se tomaron alícuotas de 3.5 mL del medio de liberación y se midió la absorbancia de las mismas a 220 nm empleando un espectrofotómetro UV-VIS Agilent. Una vez tomadas las lecturas, las alícuotas eran devueltas al medio de liberación. Los ensayos se realizaron por triplicado a valores de pH 5, 7.4 y 9 a 25°C y a 37°C para determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la cinética de liberación del fármaco.



Figura 19. Ensayo *in vitro* de liberación

3.6 Estudios de Biocompatibilidad

3.6.1 Cultivo Celular

Las células L-929 procedentes de tejido conectivo C34 / An de ratón se obtuvieron de la Colección europea de cultivos celulares (Sigma-Aldrich). Las células L-929 para los experimentos realizados se cultivaron en un matraz de cultivo celular T-25, en medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Caisson

Labs, USA) suplementado con suero bovino fetal (Gibco) al 5%, antibióticos 1% (10 mg /mL estreptomina, 10 000 U penicilina, Sigma) a 37 °C, 5% de CO₂ y 80% de humedad. Cuando se alcanzó un crecimiento confluyente, se realizó el pasaje celular, para ello las células se lavaron dos veces con solución salina y se despegaron con una solución de tripsina-EDTA (Sigma) al 0,25 %. Se centrifugó la suspensión celular (7 min, 1200 rpm), se decantó el líquido sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco y se sembró de nuevo una fracción en un frasco de cultivo hasta alcanzar la fase exponencial. Después del tercer pasaje, las células pudieron ser utilizadas para el ensayo de citotoxicidad, para ello, las células se contaron, tomando una alícuota de 90 µL de la suspensión, se colocaron en un microtubo y se adicionaron 10 µL de azul de tripano. De esta nueva disolución se tomaron 10 µL y se colocaron en una cámara de Neubauer para observarlas en un microscopio invertido Olympus IX 71. Después de contar las células se realizó el cálculo con la ecuación 4

$$\frac{\text{Total de células}}{4} \cdot 10000 = \# \text{células/mL} (4)$$

Posteriormente se preparó una suspensión a la concentración deseada para el ensayo.

3.6.2 Preparación de la muestra

El material previamente se esterilizó durante 30 minutos con una lámpara UV. Se agregó medio de cultivo suplementado y se incubó a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se prepararon diluciones del material (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.250 mg/mL, 3.125 mg/mL).

3.6.3 Ensayo *in vitro* de citotoxicidad

Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 10 000 células por pozo. Se incubaron durante 2 horas y se retiró el medio de cultivo dejando las células adheridas. Se agregó inmediatamente 100 µL de disoluciones del material a diferentes concentraciones. Después de 1, 2 y 3 días de incubación, las disoluciones se probaron con el cultivo celular. Para la evaluación del efecto de

la concentración de los hidrogeles, se sembraron las células L-929 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10 000 células por pocillo.

Posteriormente, las células se incubaron durante 24, 48 y 72 horas y se evaluó su viabilidad midiendo la reducción de resazurina que fue añadida a las muestras y se incubó a 37 ° C durante 4 h. La resazurina añadida fue preparada justo antes del ensayo a partir de una solución stock de resazurina 4mg/mL disolviendo en proporción 1:200 con medio de cultivo suplementado. La absorbancia de las muestras se midió usando un lector de placas de espectrofotómetro (Multilabel Counter, 1420 Victor, Perkin Elmer) a 570 nm y 600 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se expresan como diferencia porcentual en la reducción entre las células tratadas y de control y se calculó mediante la ecuación (5):

$$\%viabilidad = \frac{(O_2 \cdot A_1) - (O_1 \cdot A_2)}{(O_2 \cdot P_1) - (O_1 \cdot P_2)} \cdot 100 \quad (5)$$

donde O_1 es el coeficiente de extinción molar (E) de la resazurina a 570 nm, O_2 es la E de la resazurina a 600 nm, A_1 es la absorbancia de los pocillos de prueba a 570 nm, A_2 es la absorbancia de los pocillos de prueba a 600 nm, P_1 es la absorbancia del pocillo de control de crecimiento positivo a 570 nm, P_2 es la absorbancia del pocillo de control de crecimiento positivo a 600 nm.

4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis de hidrogeles de poli(ácido γ -glutámico)

Se obtuvieron hidrogeles de γ -PGA de color amarillo muy claro y transparente (Figura 20). El gamma-PGA utilizado se obtuvo a partir de la biosíntesis de bacterias Gram positivo pertenecientes al género *Bacillus*. El EDC se utilizó como activador de los grupos carboxilos del polímero para facilitar la reacción de amidación con los grupos de amina primaria de la urea empleada como agente entrecruzante. En la Figura 21 se muestra un esquema general de la reacción mediante la cual se entrecruza el γ -PGA.



Figura 20. Hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico)

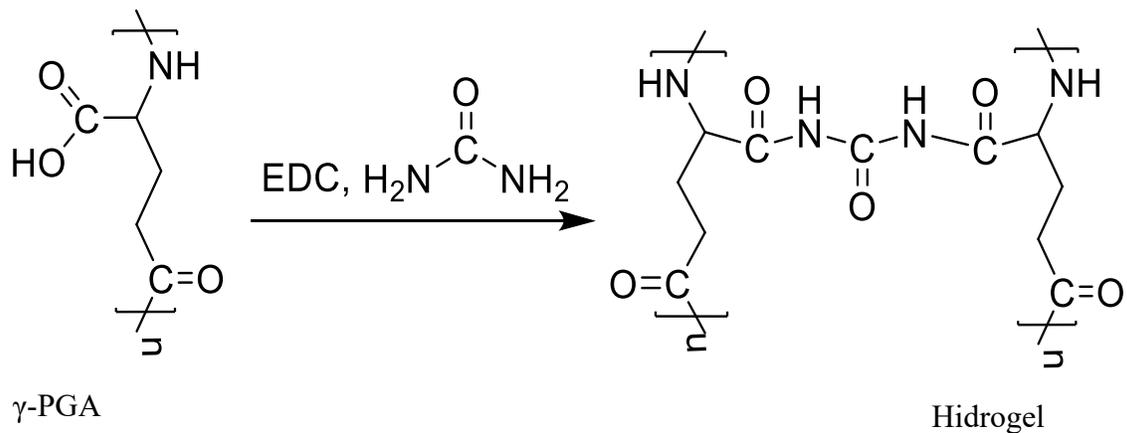


Figura 21. Reacción de entrecruzamiento

4.2 Caracterización de los hidrogeles cargados con sulfato de neomicina

4.2.1 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR)

Entre el hidrogel sintetizado y el biopolímero a partir del cual fue obtenido se espera una gran similitud en sus espectros infrarrojos, porque ambos poseen los mismos grupos funcionales, los cuales incluyen grupos carboxilos libres y amidas. Por otra parte, como a los hidrogeles se les incorpora el sulfato de neomicina se espera que señales características del fármaco también aparezcan en su espectro y de esta manera se pueda corroborar la presencia del medicamento en la matriz polimérica. Al analizar los espectros del poli(ácido- γ -glutámico) y el hidrogel en la Figura 22, se puede observar en ambos casos la aparición de las mismas señales aunque se aprecian diferencias en las intensidades de las mismas.

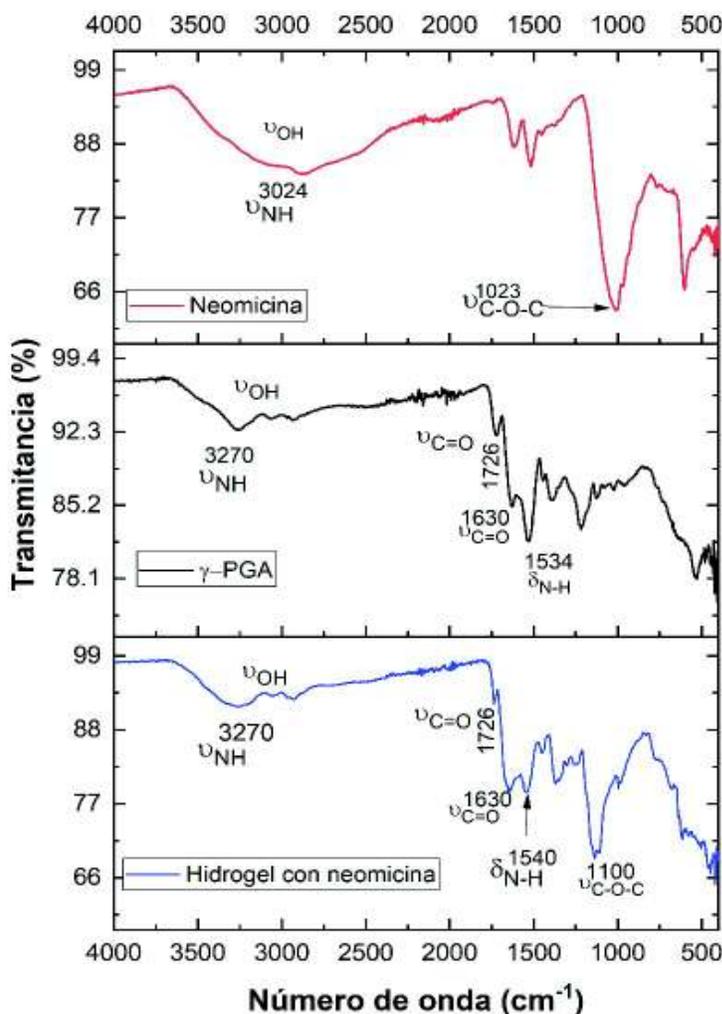


Figura 22. Espectros IR de la neomicina, el γ -PGA y el hidrogel cargado con neomicina

Respecto a las señales correspondientes al grupo funcional carboxilo, se observa una banda ancha entre los 2500-3500 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de OH y una banda en 1726 cm^{-1} asignada a la vibración de estiramiento C=O. La disminución de la intensidad de la banda del carbonilo de ácido en el hidrogel se atribuye al entrecruzamiento, dada la disminución de grupos carboxilos libres en la estructura.

En el caso del grupo funcional amida, en ambos espectros se observan dos bandas. Las bandas en 1630 cm^{-1} fueron asignadas a la vibración de estiramiento del C=O, mientras que las bandas en 1534 cm^{-1} en el polímero y 1540 cm^{-1} en el hidrogel cargado con neomicina se asignaron a la vibración de flexión N-H de amina primaria.

En el espectro de la neomicina la banda N-H aparece localizada en 3024 cm^{-1} , mientras que en el hidrogel esta banda se localiza en 3270 cm^{-1} lo cual puede ser producto de las interacciones entre las cadenas del polímero y el fármaco. La banda localizada en los 1023 cm^{-1} en el espectro de la neomicina se asignó al estiramiento de C-O-C, la presencia de esta banda en el hidrogel hacia los 1100 cm^{-1} corrobora la presencia del fármaco en la matriz polimérica y su desplazamiento de 1023 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} se puede atribuir a la existencia de interacción entre el fármaco y el polímero.

4.2.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En las Figuras 23, 24 y 25, se presentan los termogramas correspondientes al análisis por TGA y su derivada de la neomicina y de los hidrogeles de γ -PGA sin fármaco y cargados con sulfato de neomicina respectivamente. Los porcentajes de pérdida de peso y las temperaturas a las que estas tuvieron lugar en cada uno de los materiales, se muestran en la tabla 1.

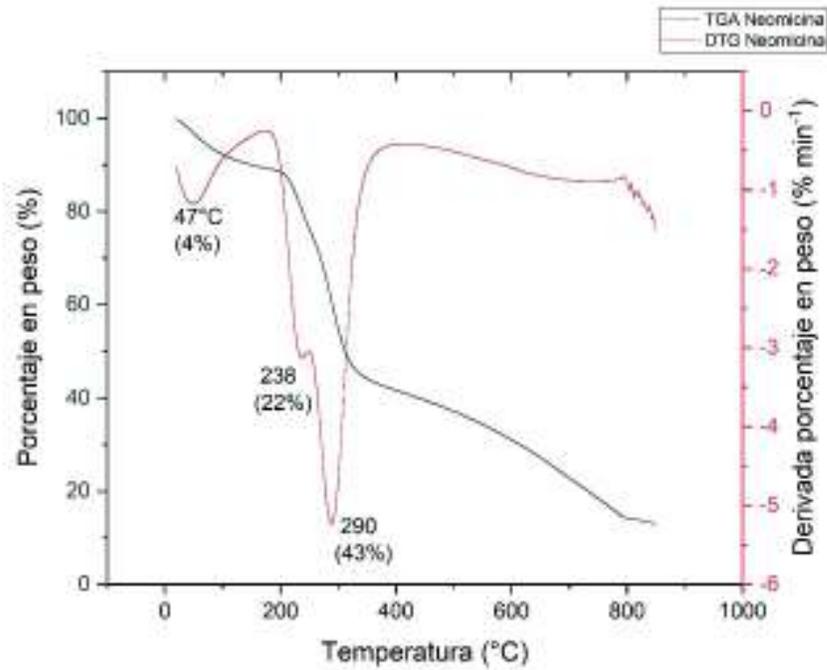


Figura 23. Termogramas TGA y DTG neomicina

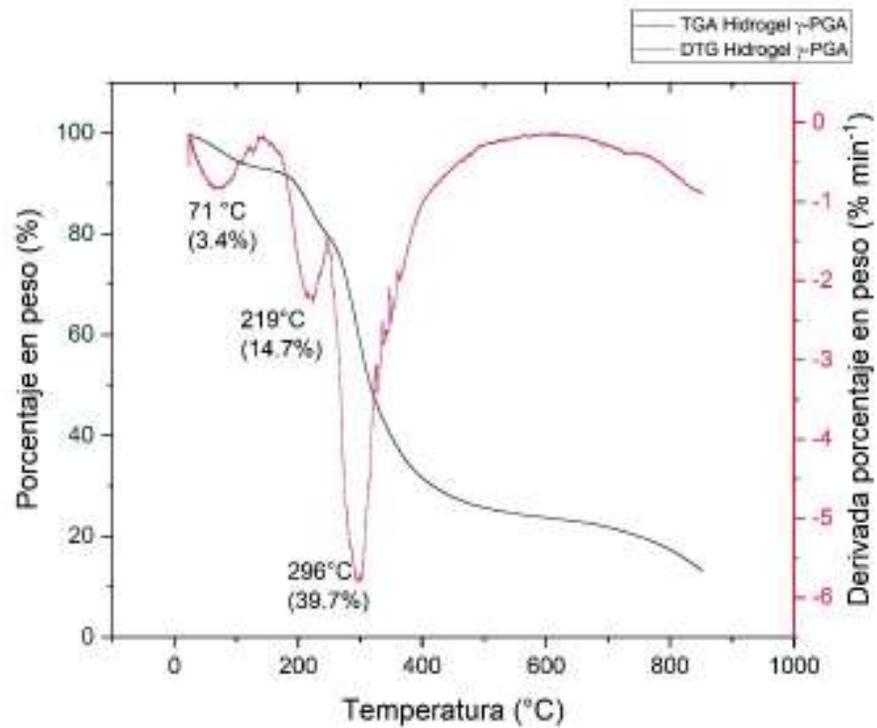


Figura 24. Termogramas TGA y DTG Hidrogel γ -PGA

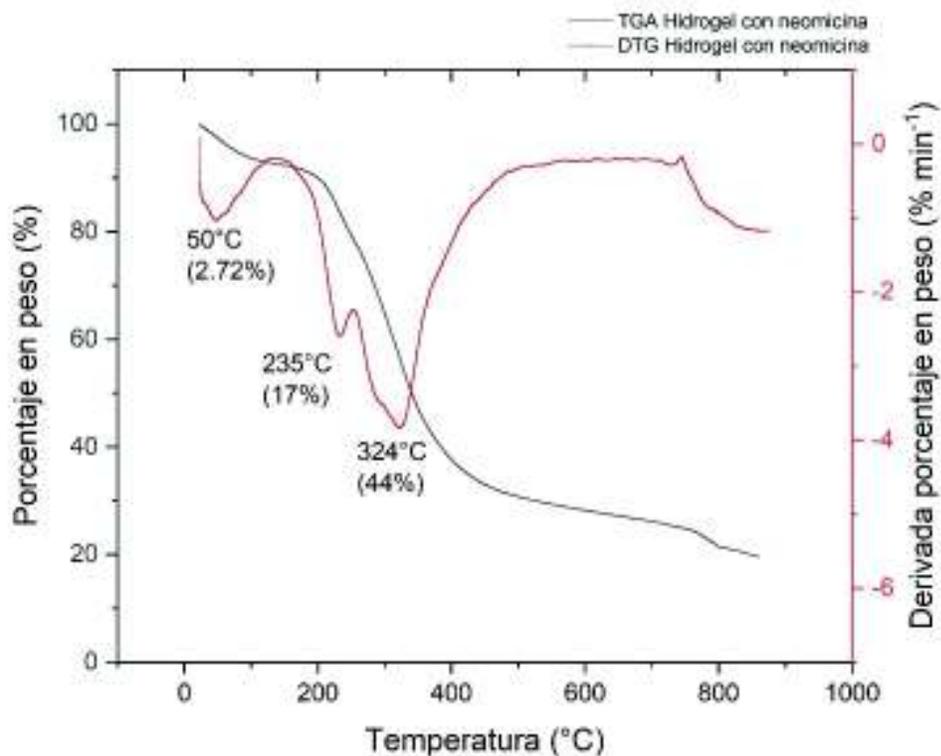


Figura 25. Termogramas TGA y DTG Hidrogel γ -PGA con neomicina

Tabla 1. Resultados análisis TGA, de la neomicina y de los hidrogeles sin fármaco y cargados con sulfato de neomicina

	Perdida de H₂O Temperatura (°C), pérdida de masa (%)	Perdida por degradación térmica Temperatura (°C), masa perdida (%)
Neomicina	47°C (4%)	238 (22%); 290°C (43%)
Hidrogel γ-PGA	71.4 °C (3.4%)	219.6 °C (14.7%); 296.5 °C (39.7%)
Hidrogel con neomicina	50°C (2.71%)	235°C (17%); 324 °C (44%)

Los resultados obtenidos de los análisis termogravimétrico mostrados en la tabla 1, reflejan las temperaturas de descomposición térmica de la neomicina, del hidrogel de γ -PGA, y del hidrogel cargado con fármaco, las cuales inician a 238°C ,219°C y 235°C respectivamente. Como se puede apreciar el hidrogel con sulfato de neomicina comienza a descomponerse a una temperatura ligeramente menor que

el fármaco pero mayor respecto al hidrogel sin fármaco, evidenciándose un aumento en la estabilidad térmica de los hidrogeles dadas las interacciones con el sulfato de neomicina.

4.2.3 Microscopía electrónica de barrido

Se realizó la caracterización morfológica de los hidrogeles cargados con sulfato de neomicina mediante un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados obtenidos no presentan grandes diferencias respecto a los reportados por otros autores [39] para hidrogeles de poli(ácido-gamma-glutámico) sin fármaco. En la Figura 26 se observan las micrografías de la superficie de los hidrogeles con neomicina a una magnificación de a) 350X, b) 500X y c) 700X. De acuerdo con las imágenes obtenidas, se puede apreciar que se trata de un material con estructura porosa, lo cual permitirá la posterior liberación del fármaco desde la matriz polimérica. Los tamaños de poro medidos se encontraron entre 24 y 27 μm .

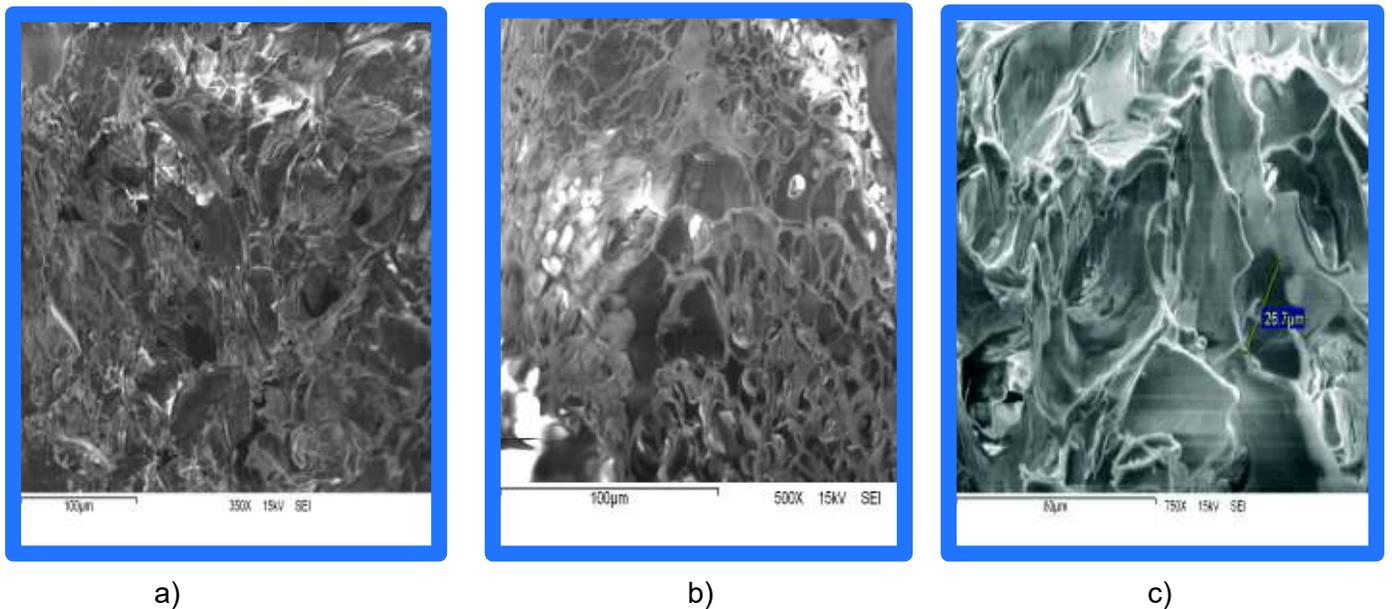


Figura 26. Microscopía Electrónica de Barrido de Hidrogeles de γ -PGA con neomicina. Magnificación a) 350X, b) 500X y c) 700X

4.3 Ensayos *in vitro* de liberación del sulfato de neomicina

El comportamiento de la liberación de un fármaco cargado en un hidrogel depende de varios factores, entre los que se encuentran: la naturaleza química de los

polímeros que forman el gel y el fármaco, la composición y estructura del hidrogel y las condiciones experimentales del medio de liberación como el pH y la temperatura [4]. En este estudio, se determinaron los efectos del pH y la temperatura sobre la tasa de liberación de sulfato de neomicina trihidratado para hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico).

En las Figuras 27 y 28 se muestran los resultados para este estudio a valores de pH de 5 y 7.4 a las temperaturas de 25°C y 37°C. Cada experimentos se realizó por triplicado y los resultados mostrados son promedios de estas repeticiones.

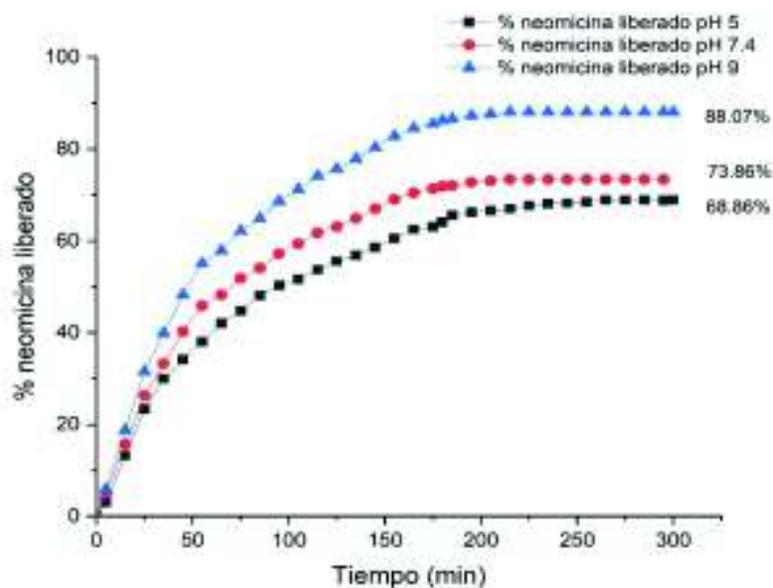


Figura 27. Ensayo de liberación a 25°C

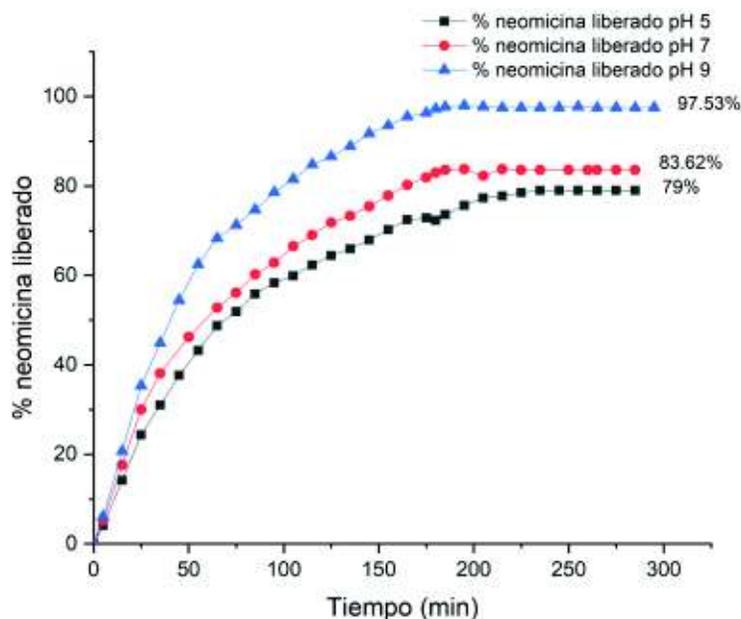


Figura 28. Ensayo de liberación a 37°C

Teniendo en cuenta que los hidrogeles en cuestión se desean emplear en la fabricación de un parche transdérmico se decidió realizar el estudio de liberación a un pH cercano al pH de la piel y a pH neutro con el objetivo de poder visualizar qué pasaba con los porcentajes de liberación del fármaco al variar este parámetro. Este criterio también fue tomado para justificar la elección de las temperaturas de trabajo, las cuales fueron la temperatura ambiente y la temperatura corporal. El medio de liberación fue un buffer de fosfato salino (PBS).

En el caso de la variación del pH pudimos observar que aumentó la liberación de 68.86% a 88.07% a la temperatura de 25°C y de 79% a 97.53% a la temperatura de 37°C, cuando pasamos de pH 5 a pH 9. Este fenómeno puede deberse al número de grupos carboxilos libres en el hidrogel, tomando como punto de partida que el pKa del poli(ácido γ -glutámico) toma valores entre 4-4,8 [29]. En el pH ácido, como es un valor cercano al pKa, al menos la mitad de los grupos carboxilos se encuentra de forma no ionizada (-COOH) los cuales pueden estar interaccionando ya sea con el fármaco o con otras cadenas del polímero y por ende una menor liberación del sulfato de neomicina. En el caso del pH básico, al ser mayor que el pKa del polímero, en este los grupos carboxilos se encuentran de forma ionizada (-COO⁻) lo cual provoca la disociación entre las interacciones del polímero con el fármaco, una mayor separación entre las cadenas dada la repulsión electrostática entre las mismas y por tanto una mayor liberación.

Al evaluar el efecto de la temperatura obtuvimos una mayor liberación a medida que esta aumentó, liberándose a 25°C como máximo el 88.07% de sulfato de neomicina, mientras que a 37°C se logró una liberación máxima del 97.53% del fármaco, ambos a pH 9. El aumento del porcentaje de liberación se debe a la disociación de las interacciones intermoleculares entre las cadenas del hidrogel y el fármaco a 37°C, lo cual provoca que las cadenas se separen propiciando una mayor liberación del fármaco cargado. En general los hidrogeles mostraron una liberación controlada del sulfato de neomicina y en la mayoría de los casos el equilibrio se alcanzó cercano a los 240 minutos, excepto a pH 9 que se alcanzó a los 200 min.

4.4 Ajuste de la liberación a modelos matemáticos.

Después de obtener los datos experimentales, se evaluaron los diferentes modelos matemáticos en sus formas linealizadas tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Modelos matemáticos en su forma lineal

Nombre del modelo	Ecuación linealizada
Korsmeyer-Peppas	$Ln \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = nLn(t) + Ln(K_p)$
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{0.5}$
Orden Cero	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt$

Se escogió el que presentó un mejor coeficiente de correlación. Para todos los casos se seleccionaron los puntos por debajo del 60% de liberación, es decir sólo hasta $M_t/M_\infty \leq 0.60$ como lo recomiendan varios autores en sus publicaciones [84,85]. Los valores de los coeficientes de correlación obtenidos para cada modelo se presentan en la siguiente tabla 3

Tabla 3. Coeficientes de correlación obtenidos con el ajuste a modelos matemáticos

Liberación		R ² Orden Cero	R ² Higuchi	R ² Korsmeyer-Peppas
pH 5	25°C	0.8958	0.9829	0.9975
	37°C	0.9508	0.9794	0.9990
pH 7.4	25°C	0.9189	0.9861	0.9929
	37°C	0.9454	0.9793	0.9989
pH 9	25°C	0.9581	0.9733	0.9951
	37°C	0.9873	0.9540	0.9914

El modelo que presentó el mejor ajuste fue el modelo de Korsmeyer-Peppas para ambas temperaturas estudiadas, puesto que el coeficiente de correlación presentó valores entre 0.9914 y 0.9990. Los valores del exponente de liberación n y de la constante cinética k fueron calculados, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Exponente de liberación n y constante cinética K_p de modelo Korsmeyer-Peppas

Liberación		n	K_p
pH 5	25°C	0.5799	0.090
	37°C	0.5033	0.079
pH 7.4	25°C	0.5958	0.089
	37°C	0.6839	0.093
pH 9	25°C	0.9616	0.150
	37°C	0.9739	0.158

De acuerdo con los valores del exponente n , es posible proponer el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación. Cuando n toma valores cercanos a 0.5, indica que la liberación sigue un comportamiento fickiano, siendo la difusión el principal mecanismo implicado. Cuando toma valores cercanos a 1 indica que la liberación está controlada por procesos de relajación de las cadenas en la matriz polimérica. Como los valores de n en este estudio se encuentran entre 0.5 y 1 esto indica un mecanismo de liberación en el que influyen ambos procesos: la relajación de las cadenas poliméricas y la difusión, por lo tanto se considera un mecanismo de difusión "anómala".

4.5 Ensayo *in vitro* de citotoxicidad

Los resultados obtenidos en el experimento de citotoxicidad de los hidrogeles realizado mediante la preparación de diluciones del material a diferentes concentraciones y evaluadas en los días 1, 2 y 3 se pueden observar en la Figura 28. De acuerdo con el procedimiento estandarizado ISO 10993 para pruebas de Citotoxicidad *in vitro*, se considera citotóxico a un material si su viabilidad es menor a 70%.

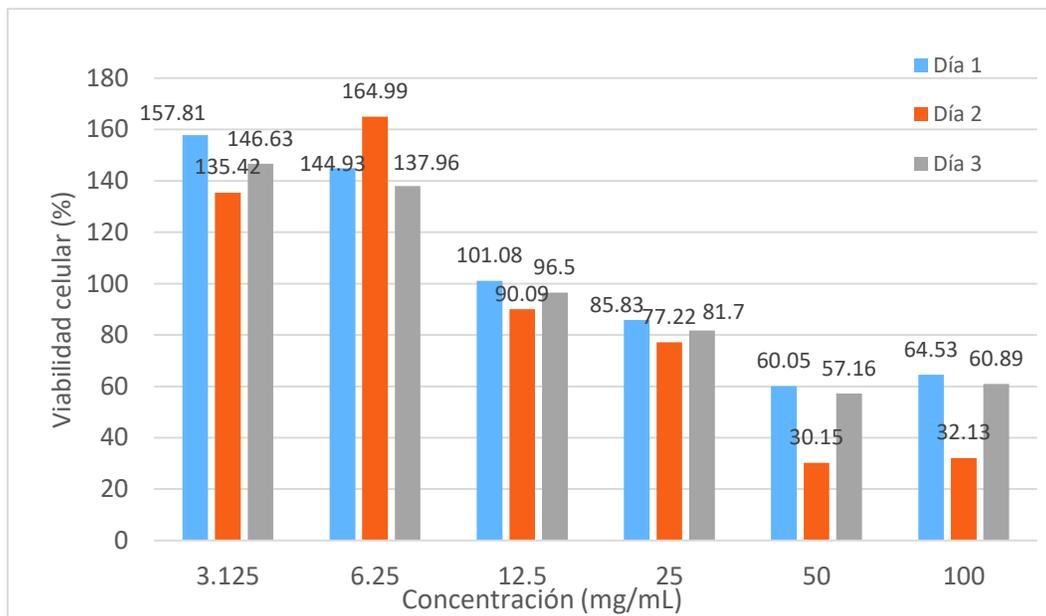


Figura 29. Evaluación de la citotoxicidad para diluciones de hidrogel de γ -PGA

Los resultados del ensayo arrojaron que las disoluciones con mayor concentración de hidrogel resultaron citotóxicas, siendo estas las de 50 mg/mL y 100 mg/mL, mostrando una viabilidad celular inferior al 65% en los tres días evaluados. Para el caso de las disoluciones más diluidas (3.125 mg/ml, 6.250 mg/mL y 12.5 mg/mL), los resultados mostraron una viabilidad celular superior al 100% del número total de fibroblastos empleados para el ensayo. En el caso de la disolución de concentración 25 mg/mL mostró una viabilidad favorable superior al 70%. Teniendo en cuenta todo esto se puede plantear que aunque el poli(ácido- γ -glutámico) es considerado un polímero biocompatible, en el caso de hidrogeles obtenidos a partir de este biopolímero, la biocompatibilidad de los mismos depende de la concentración en que estos se encuentren en el medio de cultivo.

5. Conclusiones

- Se sintetizaron hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico).
- Se corroboró la presencia del fármaco en el hidrogel y su interacción con el γ -PGA mediante la señal C-O-C de la neomicina en el espectro infrarrojo del hidrogel. Mientras que la disminución de la intensidad de la banda del grupo carbonilo del ácido carboxílico se atribuyó al entrecruzamiento químico.
- Los hidrogeles cargados con el fármaco mostraron una estructura porosa. Por otro lado, la presencia del fármaco evidenció una mejor estabilidad térmica en el hidrogel.
- El porcentaje de liberación aumentó a medida que aumentaron tanto el pH como la temperatura, alcanzándose el equilibrio a los 240 minutos excepto para el pH 9 a 37°C que se alcanzó a los 200 min. El mejor ajuste se obtuvo para el Modelo de Korsmeyer-Peppas y según los valores calculados del exponente de liberación, esta ocurre mediante un mecanismo de difusión anómala.
- Los hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico) muestran una biocompatibilidad dependiente de su concentración en el medio de cultivo. Resultando citotóxicos a 100 mg/mL y 50 mg/mL, mientras que son biocompatibles a las concentraciones de 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.125 mg/mL y 3 mg/mL.

6. Recomendaciones

- Realizar ensayos de citotoxicidad en hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico) cargados con sulfato de neomicina.
- Realizar estudios de biodegradación de los hidrogeles
- Sintetizar hidrogeles de redes interpenetradas a base de poli(ácido- γ -glutámico) y otros biopolímeros

7. Referencias

- [1] Patel RB, Patel R, Patel J, Patel V, Kinjal S. A promising approaches of colon targeted drug delivery system. IJPRBS. 2014;3(2):814-26.
- [2] Yodmuang, S. L. Mcnamara, A. B. Nover, B. B. Mandal, M. Agarwal, T.-A. N. Kelly, P.-H. G. Chao, C. Hung, D. L. Kaplan, And G. Vunjak-Novakovic, "Silk Microfiber-Reinforced Silk Hydrogel Composites For Functional Cartilage Tissue Repair.," *Acta Biomater.*, 2015, Vol. 11, 27–36.
- [3] Ahmed, E. M. "Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review," *J. Adv. Res.*, 2015 Vol. 6, No. 2, 105–121.
- [4] Soto D., Oliva H. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: una revisión. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* 2012; 32 (2): 154-175.
- [5] Katime I, Katime O, Katime D. Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Primera Edición: Universidad del País Vasco, España, 2004, 336.
- [6] Yoshida R, Okano T. Stimuli-Responsive Hydrogels and Their Application to Functional Materials: Ottenbrite RM, Park K y Okano T. (eds.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, USA. Springer Science. 2010,19-43.
- [7] Pinzón N, Espinosa A, Perilla J, Hernáez E, Katime I. *Rev. Iberoamer. Polím.* 2002; 3(2): 38-54.
- [8] Shastri VP. Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future. *Current pharmaceutical biotechnology.* 2003;4(5):331-7.
- [9] Shih IL& Van YT. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* 2001, 79: 207–225.
- [10] Dragan ES. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chem Eng J.* 2014; 243:572-90.
- [11] Kim, S. J., Lee, K. J., & Kim, S. I.. Swelling behavior of polyelectrolyte complex hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid. *Journal of applied polymer science*, 2004, 93(3), 1097-1101.
- [12] Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 2011,. 36(8), 981-1014.
- [13] D. Klempner, *Concise Encyclopedia of Polymer Science and engineering*, John & Sons, New York, 1990.

-
- [14] E. Beniash, J.D. Hartederink, Storrie, J. C. Stendahl, S. Biomaterialia, 2005, 1, 387-397.
- [15] D. J. Adams, Macromolecular Bioscience, 2011, 11, 160-173.
- [16] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. Prog Polym Sci. 2012;37(1):106-26.
- [17] Rogel-Hernández, E., Licea-Claveríe, A., Cornejo-Bravo J. M., Friedrich Arndt, K. Preparación de hidrogeles anfífilicos sensibles a diferentes valores de pH utilizando monómeros ácidos con espaciadores hidrofóbicos. Revista de la Sociedad Química de México, 2003, Vol. 47, Núm. 3, 251-257
- [18] J. Zhu, R. E. Marchant, Expert Review of medical devices, 2011, 8, 607-626.
- [19] Ramirez, Arnaldo, Benítez, José Luis, Rojas de Astudillo, Luisa, & Rojas de Gáscue, Blanca. Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 2016. 36(2), 108-130
- [20] Lizawa T, Taketa H, Maruta M, Ishido T, Gotoh T, Sakohara S. Synthesis of porous poly(N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their morphology. Journal of Applied Polymer Science. 2007;104(2):842-50
- [21] Jeyanthi R., Rao K.P. In vivo biocompatibility of collagenpoly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. Biomaterials, 1990, 11(4), 238-243.
- [22] París R, Quijada-Garrido I. Swelling and hydrolytic degradation behaviour of pH-responsive hydrogels of poly[(N-isopropylacrylamide)-co-(methacrylic acid)] crosslinked by biodegradable polycaprolactone chains. Polymer International. 2009;58(4):362-7.
- [23] A.K Bajpai, S. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery", Progress in Polymer Science, 2008, vol. 33, pp. 1088–1118.
- [24] Lodeiro, Y. Criogeles compuestos (polivinilalcohol-pectina) para la liberación controlada de enrofloxacin. Universidad Nacional de La Pampa
- [25] Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64:49-60.
- [26] Chen JK, Chang CJ. Fabrications and applications of stimulus-responsive polymer films and patterns on surfaces: a review. Materials. 2014;7(2):805-75.

-
- [27] Mayura Oak, Rhishikesh Mandke, Jagdish Singh. Smart polymers for peptide and protein parenteral sustained delivery. *Drug Discovery Today: Tecnology* 2012, Vol. 9 (2).
- [28] Portilla ,J. A., Muñoz S., Barradas D. M., Aguilar M. G. El ácido Poli(γ -glutámico): Producción y Aplicaciones Biomédicas. *Rev. BioTecnología*, 2012, Vol. 16(3).
- [29] Najar I. N., Das S. Poly-glutamic acid (PGA) - Structure, synthesis, genomic organization and its application: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, Vol. 6(6): 2258-2280.
- [30] Rodríguez D. E., Castillo M. M., Real D., Romero J., Ledezma A. S., Rodríguez F. Synthesis and Swelling Properties of pH- and Temperature-Sensitive Interpenetrating Polymer Networks Composed of Polyacrylamide and Poly(γ -glutamic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 119, 3531–3537, 2011
- [31] Ting C., Hao C., Yung Y., Fung M., Lin J., Horng T., Lin J., Haung K. Evaluation of chitosan/ γ -poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex for wound dressing materials. *Carbohydrate Polymers*, 2011,84, 812–819.
- [32] Rodríguez D. E., Pérez C. J., Castillo M. M., Pérez-Tello M., Romero J., Ledezma A. S., Del Castillo T., Rodríguez F. pH- and temperature-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels composed of poly(acrylamide) and poly(γ -glutamic acid) as amoxicillin controlled-release system. *Polym. Bull.*, 2012,68:197–207.
- [33] Anja Wilming, Jens Begemann, Stefan Kuhne, Lars Regestein, Johannes Bongaerts, Stefan Evers, Karl-Heinz Maurer, Jochen Büchs. Metabolic studies of -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. *Biochemical Engineering Journal*, 2013,73, 29– 37.
- [34] R. A. Gross, G. A. Birrer, A. M. Cromwick, S. A. Giannos, and S. P. McCarthy, *Biotechnological Polymers: Medical Pharmaceutical and Industrial Applications*, Ed. Technomic Publishing Co., 1993
- [35] Kubota H, Nambu Y & Endo T Alkaline hydrolysis of poly(γ glutamic acid) produced by microorganism. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1996, 34: 1347-1351
- [36] Chao Zhanga, Daoji Wua, Huixue Ren. Economical production of agricultural γ -polyglutamic acid using industrial wastes by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 2019,146, 117–123.
- [37] Sirisansaneeyakul S., Cao M., Kongklom N., Chuensangjun C, Shi Z., Chisti Y. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33, 173, 1-8.
- [38] Portilla J., Muñoz S., Barradas M. El ácido Poli(γ -glutámico): Producción y Aplicaciones Biomédicas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C.* 2012,16(3): 21-37.

-
- [39] Garmendia , Y. Síntesis y caracterización de hidrogeles de Poli(ácido-gamma-glutámico). Tesis de Maestría, Universidad de Sonora, 2020.
- [40] Shih IL & Van YT. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* 2001, 79: 207–225.
- [41] Tajima T, Ueno S, Yabu N, Sukigara S & Ko F. Fabrication and Characterization of Poly-gamma-glutamic Acid Nanofiber. *J. Appl. Pol. Sci.* 2011, 122:150-158.
- [42] Akagi T, Shima F & Akashi M. Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly (amino acid) nanoparticles. *Biomaterials.* 2001, 32:4959-4967.
- [43] Sung M, Park C, Kim CJ, Poo H, Soda K & Ashiuchi M. Natural and edible biopolymer poly-gamma-glutamic acid: Synthesis, production, and applications. *Chemical Record.* 2005, 5:352-366.
- [44] Matsuo K, Yoshikawa T, Oda A, Akagi T, Akashi M, Mukai Y, Yoshioka Y, Okada N & Nakagawa S . Development of amphiphilic gamma-PGA-nanoparticle based tumor vaccine: Potential of the nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007, 366:408-413.
- [45] Kost J., Lapidot S.A. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, 2000.
- [46] Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 2002, 54(1), 173-182.
- [47] Ratner B.D., Hoffman A.S. Synthetic hydrogels for biomedical applications. *Hydrogels for medical and related applications, ACS Symp.* 1976, 31, 1-35,.
- [48] Jeyanthi R., Rao K.P. In vivo biocompatibility of collagenpoly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Biomaterials*, 1990, (4), 238-243.
- [49] Pérez I.P. *Sistemas poliméricos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable*. Tesis de grado, Instituto de ciencia y tecnología de polímeros, Universidad Complutense de Madrid, 2006.
- [50] Katime D., Katime O., Katime I.A. Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial de la Universidad del país Vasco. 2004. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.
- [51] Peppas N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. CRC Press, 3, 1987.
- [52] Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2000, 50(1), 27-46.

[53] Peppas N.A., Hilt J.Z., Khademhosseini A., Langer R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Materials*. 2006,18, 1345-1360,.

[54] Lozinski V.I., Plieva F.M. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and microbial technology*, 1998, 23, 227-242,

[55] George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan-a review. *J Control Release*. 2006;114(1):1-14.

[56] Yoshida T, Lai TC, Kwon GS, Sako K. pH and ion-sensitive polymer for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(11):1497-513.

[57] Alvarez-Lorenzo C, Blanco-Fernandez B, Puga AM, Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharide for stimuli-sensitive drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(9):1148-71.

[58] Jabeen, S. Development of a novel pH sensitive silane crosslinked injectable hydrogel for controlled release of neomycin sulfate. *Int. J. Biol. Macromol*. 97, 218-227, 2017

[59] Hu,Y., Coates, A. Enhancement by novel ant - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* compound HT61 of the activity of neomycin, gentamicin, mupirocin and chlorhexidine: *in vitro* and *in vivo* studies, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 68, 374–384, 2013.

[60] Katime, I., Katime, O. & Katime, D. Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímeros. Ed. Universidad del País Vasco. Bilbao, 2004.

[61] Perez I.P. Sistemas polimericos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable. Tesis de grado, Instituto de ciencia y tecnologia de polimeros, Universidad Complutense de Madrid, 2006.

[62] Katime D., Katime O., Katime I.A. Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Sintesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial de la Universidad del pais Vasco. 2004. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.

[63] Matsuyama H., Teramoto M., Urano H. Analysis of solute diffusion in poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane. *Journal of membrane science*, 126(1), 151-160, 1997.

[64] Singhvi, G., & Singh, M. Review: *in vitro* drug release characterization models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2011, 2, 77-84.

[65] Shah, J. C., & Deshpande, A. Kinetic modeling and comparison of *in vitro* dissolution profiles. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014. 2(4), 302-309.

[66] Chacón Vera, C. Síntesis de hidrogeles interpenetrados en base a acrilamida para la recuperación de metales en agua (Tesis de maestría). Universidad Simón Bolívar, 2012.

[67] Nakamoto K., "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", Ed. John Wiley & Sons, New York, 1997.

[68] Macho S. Metodologías analíticas basadas en espectroscopía de infrarrojo y calibración multivariante. Aplicación en la industria petroquímica. Tesis de grado de Doctor en Química. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, 2002.

[69] N. Alpert, IR-Theory and Practice of Infrared Spectroscopy, Plenum/Roseta, New York (1983)

[70] Barraza G., de la Rosa L.A., Martínez A., Castillo H., Cotte M., Álvarez E. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. Rev. Latinoamer. Quím., 41, 3, 2013.

[71] Adam, M., Mossoba, M.M., Lee, T., Rapid determination of total trans fat content by attenuated total reflection infrared spectroscopy: An international collaborative study, J. Am. Oil Chem. Soc., 2000, 77, 457-462 .

[72] Cortez S. E. Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido al análisis metalográfico y fractográficos en elementos de motores. Tesis de grado de Ingeniería Mecánica. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador, 2010.

[73] Cabrera R. Obtención y caracterización de recubrimientos de Sialon mediante RF Sputtering. Tesis de grado de Ingeniería en Ciencia de los Materiales. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2007.

[74] Hernández A., Ventura J., Christoph R. Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis Elemental de componentes electrónicos y apoyo a la investigación científica en El Salvador. Nanotecnia, 2019.

[75] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman. "Principios de análisis instrumental", 5ª edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, 2001

[76] Hanke, L. Handbook of analytical methods for materials. Plymouth, 2001.

[77] Cabello, L. Investigación y Desarrollo de Óxido de Calcio como Material Sorbente de CO₂, proveniente de la Cáscara de Huevo, de tamaño nanométrico, Dopado con TiO₂, PET y Carbón Activado. Tesis de doctorado. Centro de ingeniería y desarrollo industrial, Querétaro, 2019.

[78] Williams D. Essential biomaterials science: Cambridge University Press; 2014.

-
- [79] Franco RA, Min Y-K, Yang H-M, Lee B-T. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. *Journal of biomaterials applications*. 2011
- [80] Keong LC, Halim AS. *In vitro* models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(3):1300-13
- [81] Rapado, M; Vernhes, M. y Peniche, C. Síntesis y toxicidad de hidrogeles de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo-co-acrilamida) obtenidos mediante irradiación con cuantos gamma. *Nucleus*. 2016, 29-34.
- [82] Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015;99(2):623-36.
- [83] Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*. 2013, (13)00427-6.
- [84] Andreetta H.A. Fármacos de acción prolongada: Mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Latin American Journal of Pharmacy* 22(4): 355-64.
- [85] Zamani M., Prabhakaran M., Ramakrishna S. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *Internacional Journal of Nanomedicine* 8: 2997-3017.

8. Anexos

Anexo 1



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
FOLIO DI20/000602

Aprobado por el H. Consejo Divisional de Ingeniería, en
sesión del día 18 de octubre de 2019, Acta 364

LA UNIVERSIDAD DE SONORA A través de la División de Ingeniería y el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales



Otorga la presente
CONSTANCIA

a Eleany Borges Hernández y Dora Eveleia Rodríguez Félix

Por la presentación de la ponencia:

Estudio del comportamiento de hidrogeles de poli(ácido- γ -glutámico) en la liberación controlada de fármacos

en el XIV Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales, "Responsabilidad Social en la Ciencia de Materiales",
efectuado en modalidad virtual a través de la plataforma Zoom
en Hermosillo, Sonora, México del 10-12 de marzo de 2021.


Dra. Teresa Del Castillo Castro
Jefa del Departamento


Martín Antonio Encinas Romero
Director de la División

Anexo 2

