Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

"EVALUACIÓN DEL POLIMERO POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) (PNIPAM) COMO TRANSPORTADOR DE INDOMETACINA"

TESIS

Que para obtener el Título de:

Licenciado en Ingeniero Químico

Presenta:

ALEJANDRA MEZA SALGADO

Directora de Tesis:
Dra. Valeria J. González Coronel
Co-Director
M.C. Marco Antonio González Coronel

H. Puebla de Zaragoza, Junio 2016

DEDICATORIA

Familia, amigos y personas especiales en mi vida, no son nada más y nada menos que un solo conjunto: no podría sentirme más ameno con la confianza puesta sobre mi persona, especialmente cuando he contado con su mejor apoyo.
Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes; he logrado concluir con éxito un proyecto que en principio podría parecer tarea titánica e interminable.

Quisiera dedicar mi tesis a ustedes, Sr. Mayolo Meza Flores, Sra. Ma. Del Carmen Salgado C., a mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PROMEP: Red de Fluidos Complejos por el apoyo en la realización de la presente tesis.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por la beca otorgada para la culminación de la presente tesis.

A mis asesores la Dra. Valeria Jordana González Coronel y el M.C. Marco Antonio González Coronel por el apoyo y esfuerzo invertido en la realización y culminación de esta tesis. A mis sinodales por el tiempo y apoyo proporcionado en sus observaciones y correcciones del presente trabajo.

A la M.C. Hortensia Maldonado Textle y a la L.C.Q. Judith Cabello Romero por la ayuda y el apoyo en las caracterizaciones de GPC y RMN. Departamento de Síntesis de Polímeros. (CIQA).

Al Dr. Efraín Rubio Rosas (Dr. Ricardo Agustín y Dr. Jenaro Valera) por la caracterización en DSC, SEM y Rx. Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT). BUAP.

Finalmente, al resto de profesores y compañeros que de una u otra forma me han prestado su ayuda para el desarrollo de este trabajo.

“cuanto más alto coloque el hombre su meta,
tanto más crecerá.”

Jhon Christoph Friedrick Schiller

ÍNDICE

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA 1
ÍNDICE DE FIGURAS 7
ÍNDICE DE ABREVIATURAS 8
INTRODUCCIÓN 9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 10
JUSTIFICACIÓN 11
OBJETIVO 12
CAPÍTILO I 13
ANTECEDENTES 13
1.1. INDOMETACINA 14
1.1.2. EFECTOS TÓXICOS. 16
1.2. POLÍMEROS 17
1.2.1. POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) (PNIPAM). 17
1.2.2. COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA CRÍTICA INFERIOR DE DISOLUCIÓN (LCST). 18
1.2.3. POLIMERIZACIÓN RADICÁLICA CONTROLADA. 19
1.2.3.2. POLIMERIZACIÓN CONTROLADA POR REACCIONES REVERSIBLES DE ADICIÓN-FRAGMENTACIÓN (RAFT). 20
1.3. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FARMACOS 22
1.3.1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN. 24
1.3.2. EMPLEO DE POLIMEROS EN LIBERACIÓN CONTROLADA. 25
1.3.2.1. MÉTODOS DE LIBERACIÓN. 25
1.4. MICROENCAPSULACIÓN 26
1.4.1. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN. 30
CAPÍTULO II 33
METODOLOGÍA 33
2.1. ORIGEN Y PUREZA DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS 34
2.2. SÍNTESIS DE LA POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA) (PNIPAM) 34
2.4. ESPECIFICACIONES DE LOS EQUIPOS 37
2.4.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). 37
2.4.2. Cromatografía de permeación en gel (GPC). 37

2.4.3. Reología. 37
2.4.4. Turbidimetría. 38
2.4.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). 38
2.4.6. Difracción de Rayos-X. 38
2.4.7. Microscopía Electrónica de Superficie (SEM). 39
2.4.8. ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE. 39
2.5. VALORACIÓN 39
2.6. DISOLUTOR 40
CAPÍTULO III 41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PNIPAM 42
3.1.1. ANÁLISIS TERMICO (TGA, DSC). 43
3.1.2. DRX. 47
3.1.3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM). 48
3.2. CARACTERIZACIÓN DE IMC 49
3.2.1. ANÁLISIS TÉRMICO (TGA, DSC). 49
3.2.2. DRX. 51
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS 51
3.3.1. ANÁLISIS TÉRMICO (TGA, DSC). 51
3.3.2. DRX. 56
3.3.3. SEM. 58
3.4. CUANTIFICACIÓN DEL FÁRMACO 60
TRABAJO FUTURO 66
BIBLIOGRAFÍA 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Molécula de Indometacina (IMC) 15
Tabla 1.1 Propiedades Fisicoquímicas de la IMC 15
Figura 1.2. Estructura de polímero PNIPAM, rodeada con moléculas de agua por puente de hidrógeno. 19
Figura 1.3. Mecanismo básico de polimerización RAFT 22
Figura 1.4. Estructuras típicas de microcápsulas y microesferas 28
Figura 1.5. Perfiles de concentraciones plasmáticas frente a tiempo para un producto microencapsulado de liberación controlada (A) y una forma farmacéutica convencional (B) dosis orales. 29
Tabla 1.2. Método de microencapsulación 30
Figura 1.6. Método de emulsión o/a 31
Figura 1.7 Método de emulsión o/o 32
Tabla 2 .1. Lista de reactivos utilizados 34
Figura 2.1. Representación esquemática para la obtención de Poli (N-isopropilacrilamida) 35
Figura 2.2 Sistema de reacción del homopolímero Poli(N-isopropilacrilamida). 35
Tabla 2.2 Cantidades correspondientes de PNIPAM e IMC, para la preparación de microcápsulas 36
Figura 2.3. Microencapsulación de NIPAM+ IMC 36
Figura 2.4. Equipo disolutor con seis reactores 40
Figura 3.1 Espectro de RMN 1H de la PNIPAM D_2O 43
Figura 3.2. Termograma DSC correspondientes a la PNIPAM. 44
Figura 3.3. a) Termograma TGA correspondiente a la PNIPAM b) derivada TGA ($\Delta m/\Delta T$ vs T) 45
Tabla 3.1. Datos obtenidos de GPC de PNIPAM 45
Figura 3.4. Cromatografia de PNIPAM 46
Figura 3.5. Viscosidad contra temperatura de PNIPAM. 46
Figura 3.6. Variación de la turbidez en función de la temperatura de PNIPAM 47
Figura 3.7. Difragtograma de la PNIPAM 48
Figura 3.8. SEM de PNIPAM 49
Figura 3.9 a) Termograma TGA correspondiente a la IMC b) derivada TGA ($\Delta m/\Delta T$ vs T) 50
Figura 3.10. Termograma DSC correspondientes a la IMC 50
Figura 3.11. Difractograma de IMC 51
Figura 3.12. a) Termograma TGA para la microcápsula 1, b) primera derivada del TGA 52
Figura 3.13. a) Termograma TGA para la microcápsula 2, b) primera derivada del TGA 53
Figura 3.14. a) Termograma TGA para la microcápsula 3, b) primera derivada del TGA 53
Figura 3.15 Termograma DSC correspondientes a la microcápsula1. 54
Figura 3.16. Termograma DSC para la microcápsula 2 55
Figura 3.17. Termograma DSC de la microcápsula 3. 56
Figura 3.18. Difractograma correspondiente a cada microcápsula y materia prima. 57

Figura 3.19. SEM de la muestra 1 (0.5gr PNIPAM+1gr IMC)……..58
Figura 3.20. SEM de la muestra 2 (1gr PNIPAM+1gr IMC)……59
Figura 3.21. SEM de la muestra 3 (1.5gr PNIPAM+1gr IMC)……60
Figura 3.22. Espectros de absorción de UV de la IMC de referencia, Cápsulas comerciales y microcápsulas al minuto 15 61
Figura 3.23. Variación de la concentración en función al tiempo 64

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACVA	4-4 Azobis Acido Cianovalérico
BDB	Ditiobenzoato de bencilo
CRP	Polimerización radical controlada
DRX	Difracción de Rayos X
DSC	Calorimetría Diferncial de Barrido
IMC	Indometacina
LCST	Temperatura Crítica Inferior de Disolución
nm	Nanómetros
NIPAM	N-isopropilacrilamida
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida)
RAFT	Polimerización Controlada por Reacciones Reversibles de Adición-Fragmentación
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
Tc	Temperatura de cristalización
Tf	Temperatura de fusión
Tg	Temperatura de transición vítrea
UCST	Temperatura Crítica Superior de Disolución
µm	micromolar
UV-v	UV-visible

INTRODUCCIÓN

Los medicamentos de acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que comparten no solo acciones terapéuticas, sino también la mayoría de los efectos adversos. De entre ellos la indometacina es un producto de síntesis de laboratorio perteneciente al grupo de los principios activos con actividad antiinflamatoria y de carácter no esteroideo, sus efectos antiinflamatorios son de gran utilidad terapéutica en pacientes con artritis reumatoide.

La principal limitación para su formulación es la baja solubilidad en agua que presenta, lo cual dificulta el proceso de disolución del fármaco en los fluidos gastrointestinales y condiciona sus efectos tóxicos y terapéuticos [1].

Por lo cual, en los años 50 una compañía farmacéutica introdujo una nueva tecnología con la finalidad de conseguir una liberación controlada o prolongada de los fármacos [2]. La liberación controlada trata de reducir o eliminar los efectos secundarios produciendo una concentración terapéutica del fármaco que sea estable en el organismo.

Sin embargo, existen dos métodos para mejorar la acción de los fármacos que son: Liberación controlada y Liberación sostenida; los sistemas avanzados de liberación controlada ofrecen un grado significativo de libertad en la elección del lugar de aplicación [3]. Tanto el diseño como la elaboración de medicamentos de acción controlada y/o sostenida suelen ir asociados al empleo de materiales poliméricos como vehículos transportadores del principio activo, como excipientes, polímeros naturales y sintéticos (biodegradables o no), polímeros de ácido láctico y polímeros llamados pseudolátex.

Por otro lado, el estudio de la Poli (N-isopropilacrilamida) PNIPAM ha mostrado, que es muy interesante, debido a que sufre una transición de fase a 32º C (temperatura

similar a la del cuerpo humano), lo cual la convierte en objetivo de estudio para aplicaciones tales como la liberación controlada de fármacos.

La ventaja de la liberación contralada es que ofrece la libertad de elección del lugar de aplicación, los sistemas poliméricos de liberación controlada 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 [3].
Para realizar la liberación controlada se necesita de métodos como la microencapsulación, existen varios métodos (coacervación, polimerización interfacial, extracción y evaporación disolvente, atomización y atomización–congelación, suspensión en aire, gelificación iónica) adecuados para obtener microcápsulas o microesferas y se escoge uno u otro dependiendo del principio activo que queremos encapsular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según lo reportado, existen fármacos con limitaciones en su formulación, una de ellas es la baja solubilidad en agua, dificultando el proceso de disolución del fármaco en fluidos gastrointestinales y que condicionan sus efectos tóxicos y terapéuticos. En relación con el estudio de los procesos dinámicos que ocurren en el organismo, revela que estos se llevan a cabo en medios esencialmente acuosos, y que las relaciones bioquímicas ocurren entre moléculas que se encuentran en solución, o que deben disolverse para llegar al lugar de reacción o hacer efecto [1].
De la misma manera transcurre la acción terapéutica de los fármacos (y por tanto de la indometacina), su efecto final depende de su capacidad para disolverse y transferirse a través de membranas biológicas. Este medicamento por su tipo de acción, puede producir efectos no deseables en el organismo; uno de los órganos que pueden tener efectos adversos es en la función renal y el aparato digestivo,

estos efectos se relacionan con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal [3].

Por lo cual, en el presente trabajo se microencapsula la indometacina con un polímero PNIPAM, ya que este polímero mostró en estudios que se le han realizado, que puede ser utilizado para fines farmacéuticos como es la liberación controlada y/o sostenida. Los fármacos con liberación controlada se caracterizan por poseer un núcleo, que contiene el medicamento y el cual está formado por una capa externa de un polímero que tiene propiedades de gelificar frente al agua o solventes biológicos a temperaturas de 37 °C. Ya que la liberación del principio activo no sólo depende de la velocidad de disolución del mismo, sino también de los fenómenos de relajación que afectan a las cadenas del material polimérico [4]

Por ello, se realizó el trabajo de microencapsulación de la indometacina con el homopolímero PNIPAM para analizar qué tan eficaz es la liberación.

JUSTIFICACIÓN

Con base en lo mencionado anteriormente, se trabajará con el fármaco indometacina, ya que tiene efectos secundarios en el sistema nervioso central, digestivo, cardiovasculares y otros. Por ello la idea de una liberación controlada del fármaco IMC, por medio de microcápsulas a través del homopolímero Poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) para disminuir los efectos secundarios. La liberación controlada o modificada de fármacos a través del microencapsulamiento representa una de las mejores opciones para las personas que ingieren la IMC. Las ventajas inherentes de estos sistemas son su versatilidad, eficacia y bajo costo de producción [2]. La velocidad y cantidad de fármaco liberado en matrices poliméricas se ha correlacionado con distintas propiedades físico-químicas, entre las que destaca la solubilidad.

Una de las ventajas que tienen los materiales poliméricos al ser empleados como transportadores de fármacos, es que poseen un amplio intervalo de dosificación, control del lugar de liberación. La versatilidad de los polímeros y sus métodos de síntesis, permiten el control de las propiedades químicas y fisicoquímicas del fármaco, al igual que la fácil modificación de éstos, durante o después de su síntesis, lo cual proporciona un mayor intervalo de posibilidades de ser usados como transportadores.

En base a lo anterior, la elaboración de medicamentos de acción controlada y/o sostenida suelen ir asociados al empleo de materiales poliméricos. Los polímeros naturales y sintéticos han sido propuestos y examinados como sistemas de liberación de fármacos. La PNIPAM es de gran importancia, ya que presenta una transición de fase conocida como LCST aproximadamente de 32-34ºC, muy cercano a la temperatura corporal, destacando su uso como posible transportador de fármacos [5].

Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo sintetizar un polímero termosensible PNIPAM por polimerización RAFT (que nos garantiza control de pesos moleculares y polidispersidad). Dicho material será utilizado para encapsular la indometacina, evaluando su capacidad de liberación en tiempo y concentración de la IMC, como función de la actividad transportadora-liberadora de la PNIPAM.

OBJETIVO

- GENERAL

Sintetizar el homopolímero Poli (N-isopropilacrilamida) usando Ditiobenzoato de bencilo (BDB), como agente de transferencia de cadena RAFT, para microencapsular el fármaco indometacina, para el análisis de la liberación controlada del fármaco indometacina.

CAPÍTILO I

ANTECEDENTES

1.1. INDOMETACINA

La indometacina (IMC) es un compuesto perteneciente al grupo de los principios activos con actividad anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), sus efectos anti-inflamatorios son de gran utilidad terapéutica en pacientes con artrosis reumatoide y de otros tipos. La principal limitación para su formulación es su baja solubilidad en agua, lo cual dificulta el proceso de disolución del fármaco en fluidos gastrointestinales y condiciona sus efectos tóxicos y terapéuticos [1].

La IMC es el más potente inhibidor de la Ciclooxigenasa 1 (Cox1) y Ciclooxigenasa 2 (Cox2) disminuyendo la síntesis prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Es prescrito como anti-inflamatorio, analgésico y antipirético. La IMC tiene poca biodisponibilidad, el 90% de la dosis se une a proteínas plasmáticas y tejidos, bajando su disponibilidad para generar la acción. Es eliminada por heces, orina y bilis, la mayor parte de la IMC sufre transformaciones en el hígado dando metabolitos inactivos, aunque, del 10% al 20% se excreta por orina sin cambios [6].

La IMC debe contener entre 98,0 % y 101,0 % del ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético, calculado con referencia a la sustancia seca [7].

De acuerdo con estudios de los procesos dinámicos que ocurren en el organismo, revelan que estos se llevan a cabo en medios esencialmente acuosos, y que las reacciones bioquímicas ocurren entre moléculas que se encuentran en solución, o que deben disolverse para llegar al lugar de reacción o efecto. De la misma manera transcurre la acción terapéutica de los fármacos, y por tanto de la IMC, su efecto final depende de su capacidad para disolverse y transferirse a través de las membranas biológicas.

1.1.1CARACTERÍSTICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO.

La IMC 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético, mostrada en la Figura 1.1 es derivado del ácido indolacético que pertenece al grupo de los AINES no selectivos, ha estado disponible en el mercado desde principios de 1960 y se ha convertido en unos de los AINES más utilizados. Sus concentraciones máximas en plasma se alcanzan de 1 a 12 h después de la administración oral, la concentración máxima en plasma (Cmax) presenta variabilidad inter e intra individual siendo considerada 1 µg/ml la concentración terapéutica y la tóxica a partir de 6 µg/ml [8]. En la Tabla 1 se encuentran algunas características más destacadas del fármaco [6,7].

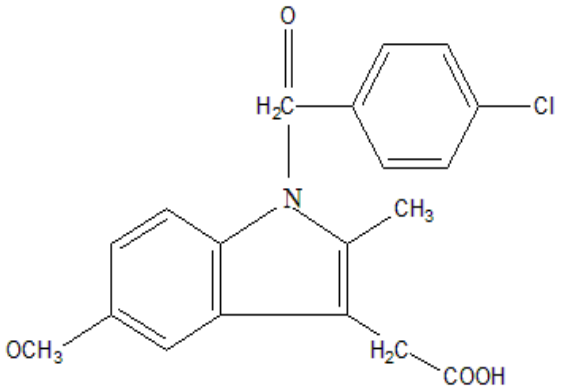

Figura 1.1. Molécula de Indometacina (IMC)

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de la IMC

Nombre primario o nombre INCI	Indometacina (IMC)
Nombre Químico	1 -(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético
Número CAS	53-86-11
Monografía oficial	USP, BP
Fórmula estructural	C19H16ClNO4
Peso molecular	357,79 g/mol

Descripción Física	Polvo cristalino amarillo pálido o amarillo tostado, con un ligero olor característico.
Solubilidad USP	Prácticamente insoluble en agua, solubilidad 1 en 50 de alcohol, 1 en 30 de cloroformo y 1 en 40 de éter.
Condiciones de almacenamiento	Almacenar en lugar fresco, recipiente hermético y protegido de la luz.
Estabilidad	La principal degradación se da por una hidrólisis en la unión amida con la formación de ácido 4-clorobenzoico y 2-metil-5-metoxiindol-3-acetato, sufre procesos de oxidación
Punto de fusión	158-162°C

1.1.2. EFECTOS TÓXICOS.

Un porcentaje elevado (35-50%) de los pacientes tratados con indometacina experimentan síntomas indeseables y cerca del 20% tienen que suspender su uso. La mayoría de los efectos adversos están relacionados con la dosis, lo que obliga a determinar la menor dosis efectiva para cada paciente. Su uso debe reducirse para enfermedades activas que no responden al tratamiento con salicilatos y otras medidas convencionales como reposo. Sus acciones indeseables más comunes comprenden [1]:

- Reacciones gastrointestinales (ulceraciones, hemorragias, sangrado gastrointestinal, gastritis, colitis, náuseas y vómitos) que pueden reducirse administrada con alimentos.

- Reacciones oculares (depósitos corneales y perturbaciones retinianas, visión borrosa).
- Reacciones hepáticas (hepatitis tóxicas o ictericia).
- Reacciones hematológicas (anemia, agranulocitosis, leuco y trombocitopenia).
- Reacciones de hipersensibilidad (respiratorias agudas, asma, disnea, prurito, urticaria, erupciones alérgicas).
- Reacciones otológicas (sordera).
- Reacciones del sistema nervioso central, cefaleas, mareos.
- Reacciones cardiovasculares (hipertensión) y renales (hematuria).

1.2. POLÍMEROS

La palabra polímero se deriva del griego poly que significa muchos y meros que significa partes. Los polímeros o macromoléculas están formados por pequeñas estructuras químicas de bajo peso molecular conocidas como monómeros. La reacción por medio de la cual se combinan los monómeros, es llamada polimerización, los monómeros reaccionan químicamente para formar una molécula de mayor tamaño. La repetición de unidades de monómero puede presentarse en forma lineal, ramificada o entrecruzadas, para formar redes tridimensionales. Los polímeros se pueden clasificar en homopolímeros, formados de una sola unidad repetida de monómero, y copolímeros, compuestos de diferentes unidades monoméricas [9].

1.2.1. POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) (PNIPAM).

Uno de los polímeros termosensibles más destacado es la PNIPAM, con una LCST de aproximadamente 32-34ºC y una temperatura de transición térmica de aproximadamente 32ºC en solución acuosa, que es ligeramente inferior a la temperatura corporal. Debido a las propiedades que presenta este material es de gran interés para el estudio y desarrollo de aplicaciones en el campo biomédico, ya

que se ubica en el cuerpo, este entorno proporcionara el estímulo necesario para inducir el cambio de fase, ya que la temperatura corporal del cuerpo humano se encuentra alrededor de los 36.5ºC [10,11].

La PNIPAM algunas veces es considerada como hidrogel ya que se puede disolver en agua y formar una solución líquida homogénea, cuando se aumenta la temperatura, la solución se separa en dos fases líquidas [12,13].

A temperaturas por debajo de la LCST, la PNIPAM es hidrosoluble, debido a que el agua es un buen disolvente, por lo tanto se forman enlaces por puente de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos amida, lo cual permite que las cadenas de polímero presenten forma de rollos [14,15].

1.2.2. COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA CRÍTICA INFERIOR DE DISOLUCIÓN (LCST).

La LCST se define como la temperatura crítica en el que la solución de polímeros se somete a una separación de las fases. Por debajo de la LCST la entalpía relacionada con la unión de hidrógeno entre el polímero y las moléculas de agua, es responsable de la disolución del polímero, al elevar la temperatura por encima de la LCST, la entropía domina y conduce a la precipitación del polímero.
Es decir, cuando la temperatura de solución de un polímero sube o baja, el disolvente eventualmente tiene un comportamiento termodinámico diferente, cuando se alcanza una temperatura más allá de la cual el polímero y el disolvente ya no son miscibles en todas las proporciones, la mezcla se separa en dos fases [14].

Se dice que un cambio dinámico toma lugar alrededor de la LCST por la transición de las esferas completamente colapsadas hacia las cadenas hidratadas. Al aumentar la temperatura por encima de la LCST las cadenas de polímeros se deshidratan, y la cantidad de segmentos colapsados aumentan. Los segmentos de

polímeros se hidratan y las moléculas de agua se mantienen en su sitio a través de enlaces hidrógeno con los grupos laterales de amida (H-O-H). Dentro de los "glóbulos" los enlaces hidrógeno (H-N) se forman entre los grupos laterales de amida a través de puentes de hidrógeno con los puentes de agua, Figura 1.2 [16].

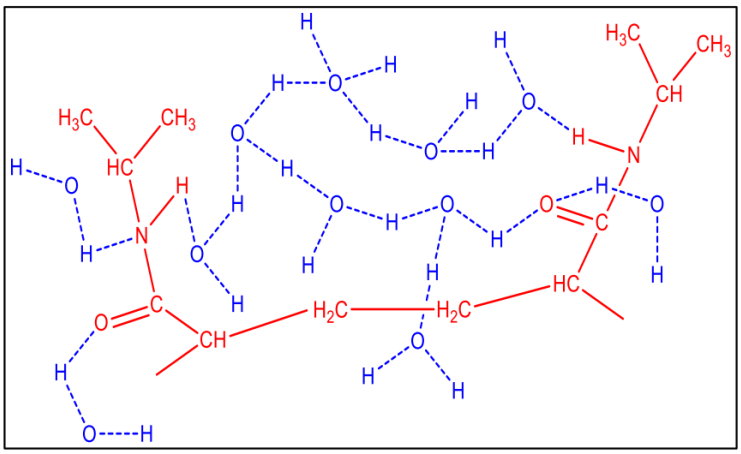

Figura 1.2. Estructura de polímero PNIPAM, rodeada con moléculas de agua por puente de hidrógeno.

1.2.3. POLIMERIZACIÓN RADICÁLICA CONTROLADA.

Recientemente, la expresión "polimerización radicálica viviente" ha emergido como una opción para la síntesis controlada de polímeros, más eficiente y sencilla que los métodos convencionales. La atención se ha enfocado en el desarrollo de las técnicas de polimerización radicálica controlada CRP (por su sigla en inglés) debido a la amplia tolerancia a grupos funcionales e impurezas, comparada con los métodos de polimerización iónica convencionales. En la última década, se ha experimentado al entendimiento, desarrollo y aplicación de los métodos CRP incluyendo la polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización mediada por reacciones reversibles de adición-fragmentación y transferencia de cadena (RAFT) y la polimerización por transferencia atómica (ATRP). Estos métodos se basan en una rápida evolución de un equilibrio dinámico entre especies activas y desactivadas.

Con el fin de lograr una CRP eficiente, se deben tener en cuenta algunos criterios:

1. Una iniciación rápida comparada con la propagación, ya que es necesario que todas las cadenas sean creadas y crezcan simultáneamente.
2. La concentración de los radicales propagantes debe ser suficientemente baja como para disminuir sustancialmente los eventos de terminación al tiempo que se permite el crecimiento de las cadenas.
3. Una velocidad rápida de intercambio entre las especies activas y durmientes, de tal forma que la mayoría de las cadenas en crecimiento estén en el estado durmiente y solo una pequeña fracción presente radicales activos como grupos terminales en la cadena.

Los tres métodos mencionados anteriormente, ATRP, RAFT y NMP, son bastante similares en cuanto al control, pero tienen diferentes mecanismos de polimerización, lo que los hace más o menos disponibles para diferentes aplicaciones. La aplicación en la industria, depende del alto grado de control sobre el peso molecular, la disminución de la dispersidad, la posibilidad de emplear catalizadores y reactivos con diversas funcionalidades [17].

1.2.3.2. POLIMERIZACIÓN CONTROLADA POR REACCIONES REVERSIBLES DE ADICIÓN-FRAGMENTACIÓN (RAFT).

La polimerización por transferencia de adición-fragmentación reversible es una de las técnicas recientes dentro de la polimerización radicálica controlada “viviente”, es un proceso que ha revolucionado el campo de la polimerización de radical libre.

En 1998 esta polimerización fue patentada por un equipo de varios investigadores de la Organización de la Comunidad Científica e Investigaciones Industriales (CSIRO) en Melbourne, Australia. Casi simultáneamente otro grupo de investigadores en Francia patentó un proceso el cual llamarón Diseño

Macromolecular Vía el Intercambio de Xantato (MADIX). El cual empleó xantato como agente controlador, que resultó ser un mecanismo idéntico al reportado por CSIRO, el proceso RAFT [9,18].

La polimerización RAFT se ha revisado extensivamente en los últimos años mostrando el inmenso interés y aplicación de esta técnica. El mecanismo RAFT es un poco más complejo que el NMP, el paso crítico en el mecanismo RAFT es el equilibrio adición-fragmentación que se aprecia en la Figura 1.3.

La iniciación y terminación se da como en la polimerización vía radicales libres, siendo la fuente de iniciación un compuesto azo, o un compuesto peróxido. En la primera etapa de polimerización, la adición de un radical propagante (I·) se da sobre el agente de transferencia RAFT presente en el medio, generando un radical intermediario (R·). Posteriormente este radical sufre una ruptura o fragmentación formando una nueva propagación de radicales para "reiniciar" la polimerización.
En la siguiente etapa este macroradical reacciona con el polímero funcionalizado, que se conoce como especie durmiente, es decir se da un equilibrio entre los radicales propagadores. De este modo se establecen reacciones periódicas entre las cadenas "durmientes" y las "activas" proporcionando la misma posibilidad para todas las cadenas de crecer, permitiendo la producción de polímeros con polidispersidad estrecha [14,17].

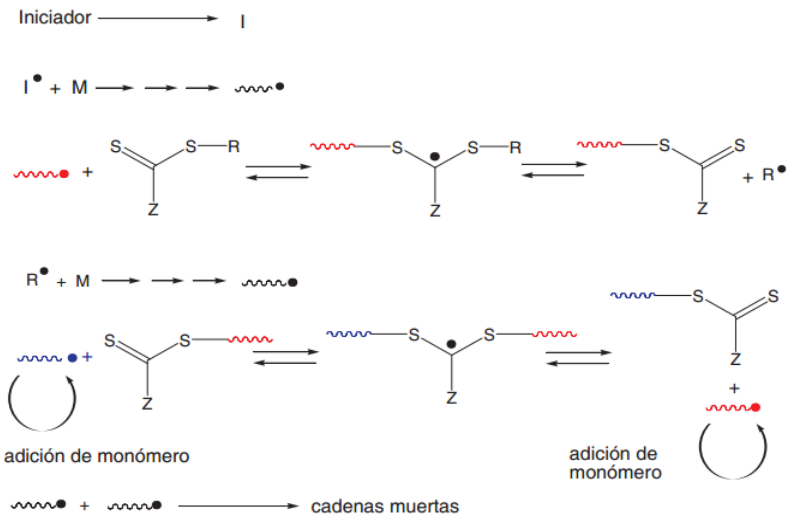

Figura 1.3. Mecanismo básico de polimerización RAFT

A pesar de la polémica existente sobre el mecanismo, RAFT es una de las técnicas más poderosas de la polimerización radicálica viviente, ya que se puede utilizar para polimerizar prácticamente todos los monómeros comúnes y se ha empleado con éxito en sistemas homogéneos (incluyendo en agua) y heterogéneos. Se puede utilizar la polimerización RAFT para sintetizar de manera sencilla copolímeros bloque, pero es importante hacerlo en el orden en el que se polimerice primero el monómero que resulte el mejor grupo saliente [19,20].

1.3. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FARMACOS

El empleo de sistemas de liberación controlada se basa en el transporte de medicamentos con alta especificidad y actividad en el lugar de aplicación, muchos de estos sistemas emplean compuestos de homo- y copolímeros biodegradables sin efectos tóxicos y ayuda a:

- Mantener el efecto terapéutico sin fluctuaciones durante largos periodos de tiempo.
- Controlar la velocidad de liberación del principio activo a través de las características del vehículo.

Estos materiales deben ser biocompatibles, lo que significa que no deben causar ninguna respuesta adversa significativa del medio fisiológico que pueda dañar el biomaterial, tras interacción con los tejidos y fluidos corporales, deben de degradarse en componentes no tóxicos, tanto química como físicamente, o por una combinación de ambos [21].

Idealmente, un sistema de liberación controlada de fármacos debe ser capaz de suministrar selectivamente el fármaco al órgano o tejido requerido. Las ventajas de estos sistemas y sus aplicaciones han sido ampliamente estudiadas [2]:

- Protege el principio activo, evitando su inactivación debido a factores químicos, enzimáticos o inmunológicos desde su administración al lugar de acción.
- Mayor aceptación por el paciente, puesto que son necesarios menos dosis.
- Incrementa la especificidad de acción, con lo que se evita el transporte de sustancias activas o tejidos no-administrables. Se consigue una mayor seguridad y concentraciones eficaces y constantes de fármaco en el lugar de acción.
- Disminuye los efectos indeseables en el tracto gastrointestinal.

Por otra parte, se pueden mencionar algunas desventajas, aunque de escasa relevancia frente a las ventajas que ofrecen estos sistemas [21,22].

- Posible toxicidad o biocompatibiladad insuficiente entre el fármaco y el vehículo.
- Dolor cuando el dispositivo es controlado en el organismo o durante la presencia del mismo.

- Elevado costo de algunos sistemas.

Existen muchos sistemas de liberación de fármacos.

1.3.1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN.

Los sistemas poliméricos de liberación controlada pueden ser localizados virtualmente en cualquier cavidad corporal, de modo que estos soportes de fármacos puedes sustituirse en el organismo en o cerca de la zona enferma.

- Ruta Transdermal (de la piel): Las enfermedades de la piel suelen tratar con cremas, esta es una forma convencional de liberar el medicamento de forma rápida, es fácilmente eliminable, pero de administración imprecisa. La liberación transdermal, donde el sistema de liberación se adhiere externamente a la piel, es una de las rutas de administración de fármacos comercialmente más aceptadas.
- Ruta Peroral: El tracto gastrointestinal es una vía de administración bastante común debido a la facilidad para ingerir los medicamentos. Aun así, existen muchos factores adversos que influyen en la disolución y absorción de fármacos. El periodo de tiempo de una liberación peroral controlada, está limitada por el tiempo de transito gastrointestinal, que es de aproximadamente 16 horas.
- Ruta Oral: Las pastillas de disolución lenta proporcionan un método para prolongar la liberación del fármaco en la mucosa. La liberación oral ofrece una accesibilidad excelente de modo que los sistemas de liberación de fármacos pueden ser incorporados y eliminados con facilidad.

Otras rutas: Existen otras rutas de administración de fármacos como la pulmonar, ocular, nasal, rectal, cerebral, etc. En principio su mecanismo de liberación es similar a las otras rutas y se basan en la disolución y difusión de los fármacos, sin embargo deben tenerse en cuenta algunos aspectos fisiológicos y anatómicos [3, 23].

1.3.2. EMPLEO DE POLIMEROS EN LIBERACIÓN CONTROLADA.

En la actualidad, tanto el diseño como la elaboración de medicamentos de acción controlada y/o sostenida suelen ir asociados al empleo de materiales poliméricos como excipientes, aunque no son los únicos. Los polímeros sintéticos (biodegradables o no) han sido propuestos y examinados como sistemas de liberación de fármacos.

Fue Speiser el primero que preparó cápsulas esféricas hechas de material polimérico capaces de vehiculizar un principio activo [2]. El método se basó en la polimerización micelar de monómeros tales como acrilamina o metil-metacrilato. La poliacrilamida tiene el inconveniente importante de no ser biodegradable.

Los copolímeros de ácido láctico/glicólico son los más prometedores transportadores de fármacos porque son biodegradables en el organismo [2].

La ventaja de uso de polímeros naturales como el alginato, quitosano o el almidón consiste en que proporcionan mayor compatibilidad, disminuyéndo el riesgo de rechazo de los materiales sintéticos por parte de las células, y se impide el desarrollo natural de estas en las cercanías del material [10,24].

1.3.2.1. MÉTODOS DE LIBERACIÓN.

La velocidad de absorción de producto medicinal que se administra en forma de tableta o en otra presentación sólida para ingestión, depende en parte de su velocidad de disolución en los líquidos gastrointestinales. El factor mencionado constituye la base para preparar los fármacos llamados de liberación controlada, extendida o sostenida, o de acción prolongada, que pueden absorberse de modo lento y uniforme durante 8 horas o más [23].

La liberación del contenido de las microcápsulas se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, cambio de temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la microcápsula o bien por medio de una membrana que recubra la pared.

La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad de los componentes de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. Por todo esto, la selección de una matriz o membrana es importante, tiene también especial relevancia, la naturaleza química, morfológica, la temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento de los componentes de la cubierta, ya que pueden disminuir la velocidad de liberación.

Vistas todas las características de las diferentes técnicas de microencapsulación y conociendo las propiedades de nuestro material, la elección del método de encapsulación depende de varios factores [25,26]:

• Tamaño de partícula: El tamaño deseado oscila entre 15-100µm, las microcápsulas mayores a 100µm son detectables en la boca, y las inferiores a 15 µm no dan la suficiente protección frente a los agentes externos.

• La técnica no debe emplear agentes externos agresivos que pudieran limitar la supervivencia de los microorganismos (en caso de que se desee microencápsular alimentos).

• Se requerirá, además, un bajo consumo energético, de forma que los costos de la técnica sean rentables industrialmente.

1.4. MICROENCAPSULACIÓN

La idea de microencapsular medicamentos surgió hasta mediados de la década de los años 50, cuando una compañía farmacéutica introdujo está tecnología con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de los fármacos [2].

La microencapsulación de medicamentos se puede definir como el método de recubrimiento de medicamentos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. A esto se le llama “micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”, sistema que se diferencia en su morfología y estructura interna, la característica común que presentan es el tamaño de la partícula, el cual es siempre inferior a 1mm [2, 27].

En función de su tamaño, se pueden clasificar en micro- y nanopartículas. Las micropartículas son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan desde 1 a 250 µm (idealmente diámetros < 125 µm). Encontrando al fármaco altamente disperso, bajo la forma de diminutas partículas o de moléculas, en el material de recubrimiento [2]. Dentro de este grupo se incluyen las:

Las microesferas y microcápsulas pueden presentar una estructura de tipo capsular o matricial:

- Microesferas: Son partículas esféricas sin una distinción entre cubierta y núcleo y con un tamaño de partícula entre una y varias decenas de micras. Tiene una estructura monolítica, el fármaco es incorporado dentro de una matriz polimérica preparada a partir de materiales biocompatibles [21].
- Microcápsulas: son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica [28].

Dependiendo del método de microencapsulación que se empleen se obtendrán microcápsulas con una u otra estructura (Figura 1.4). Incluidos en diversas formas farmacéuticas, las microcápsulas y microesferas se obtienen por microencapsulación del fármaco: proceso en el que se deposita una cubierta muy delgada de materiales poliméricos alrededor de las partículas del principio activo, ya sean sólidas o líquidas.

Este recubrimiento abarca toda la superficie de la partícula, que actúa como sustrato, siendo su aspecto externo igual a la de una sustancia pulverulenta sólida.

Las partículas así recubiertas pueden encontrarse individualizadas o, por el contrario, estar dispersas en una matriz: en este caso se tratará de microcápsulas multinucleares [28,29].

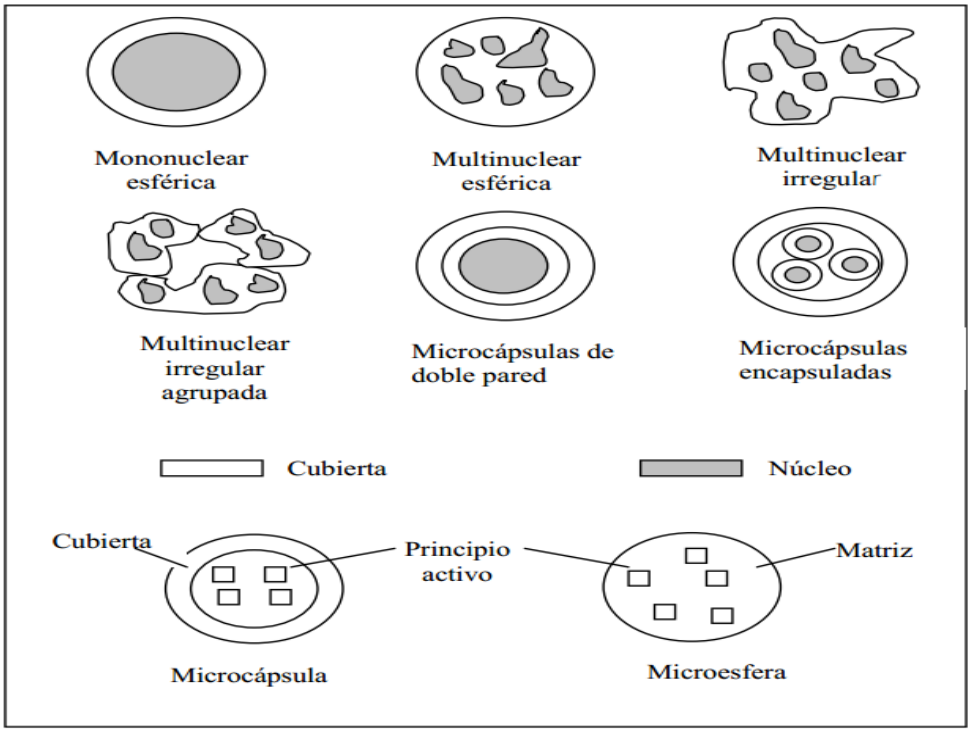

Figura 1.4. Estructuras típicas de microcápsulas y microesferas

En la Figura 1.5 se observan los diferentes perfiles de concentración plasmática, con las formas de dosificación convencionales, las concentraciones de fármaco experimentan una serie de fluctuaciones, aunque tienden a una meseta, debido a la acumulación exponencial que se produce cuando se administran dosis repetidamente a intervalos de tiempo, con las formas que portan el principio activo microencapsulado, se pretende alcanzar antes el estado estable y evitar las oscilaciones del perfil plasmático alcanzando la meseta rápidamente y manteniéndolo durante más tiempo [2,21]. No obstante, ha habido diversos intentos de clasificación, siendo quizás el más clarificador el propuesto por Ballard y Nelson, que las dividen en las siguientes:

Formas farmacéuticas de liberación controlada: Liberan inicialmente la cantidad necesaria de fármaco para conseguir tener la respuesta farmacológica deseada de forma rápida y, posteriormente, en una cantidad adecuada y constante para que la velocidad de absorción del fármaco sea igual a la velocidad de eliminación durante un tiempo prolongado.

Formas farmacéuticas de liberación convencional: Son aquellas formas farmacéuticas que inicialmente proporcionan una dosis simple de fármaco y a un tiempo posterior liberan otra dosis similar; en el intervalo de tiempo entre la liberación de una dosis y otra, no existe liberación de principio activo.

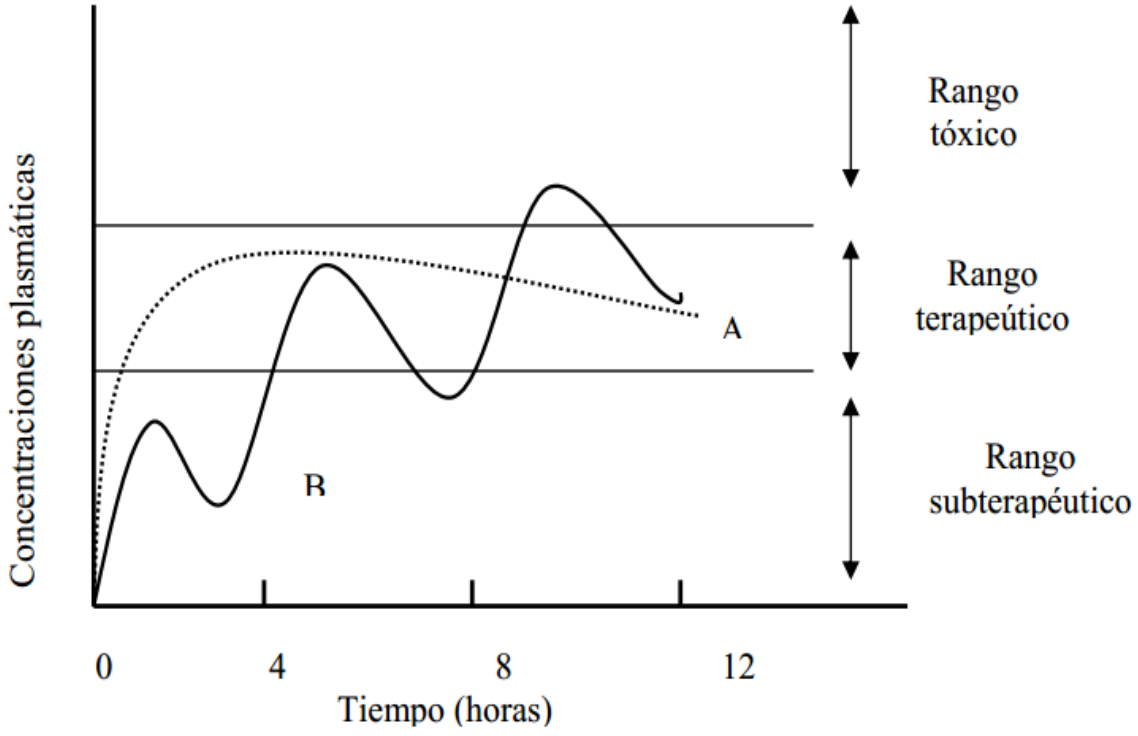

Figura 1.5. Perfiles de concentraciones plasmáticas frente a tiempo para un producto microencapsulado de liberación controlada (A) y una forma farmacéutica convencional (B) dosis orales.

1.4.1. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN.

Existen varios métodos adecuados para microencapsular fármacos y se escoge uno u otro en función de factores como: Tipo de material, el principio activo que queramos encapsular, la carga requerida o el modo en que debe liberarse.

Actualmente, el número de métodos de microencapsulación patentados asciende a varios centenares, la mayoría de los métodos que hoy se desarrollan a nivel industrial pueden agruparse en las categorías que se presentan en la Tabla 1.2. [25].

Tabla 1.2. Método de microencapsulación

MÉTODO	***MEDICAMENTO***	***TAMAÑO DE PARTICULA***
Coacervación (separación de fases)	Sólido-líquido	1-1000µm
Polimerización interfacial	Sólido-liquido	1-1000µm
Extracción y evaporación disolvente	Sólido-liquido	0.1-1000µm
Atomización y atomización – congelación	Sólido-liquido	1-1000µm
Suspensión en aire	Sólido	50-5000µm
Gelificación iónica	Sólido	Mayor 1000µm

- Extracción – Evaporación del disolvente

Esta denominación incluye todos los procesos en que tiene lugar la eliminación del solvente en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o extracción de

éste. En todos los casos previamente tienen que formarse una emulsión. Dependiendo de la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se forma se clasificarán en evaporación/extracción del solvente en fase acuosa ó en fase oleosa.

a) En fase acuosa.

Método de la emulsión aceite en agua (o/a): En este método la fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo se emulsifica en fase acuosa que contiene un tensioactivo. Posteriormente, las gotas orgánicas emulsificadas que contienen el polímero y el principio activo son endurecidas como microesferas por eliminación del solvente orgánico. En la Figura 1.6 se resume la preparación por este método.

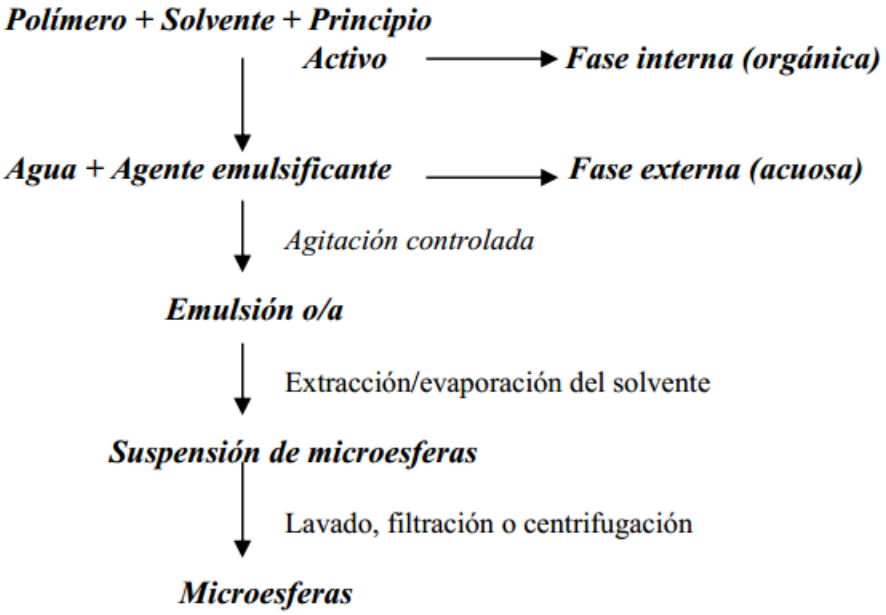

Figura 1.6. Método de emulsión o/a

Método de la emulsión agua en aceite en agua (a/o/a): También se conoce como método de emulsión múltiple, es una modificación del método o/a. Se utiliza para encapsular principios activos solubles en agua y se ha probado que es muy eficiente para encapsular este tipo de sustancias. En este método el principio activo se disuelve en agua (fase acuosa) y el polímero se disuelve en

un solvente orgánico (fase orgánica). Ambas fases se mezclan obteniéndose la emulsión o/a, la que se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un emulsificante como el alcohol polivinílico. Luego el solvente orgánico es eliminado y se obtienen las microesferas.

b) En fase oleosa

Método de emulsión aceite en aceite (o/o): Es otra modificación del método o/a y la fase continua estará formada por un líquido orgánico como aceite mineral y se forma la emulsión o/o. Se usa para encapsular eficazmente principios activos solubles en agua. En la Figura 1.7 se resume este método [3,6].

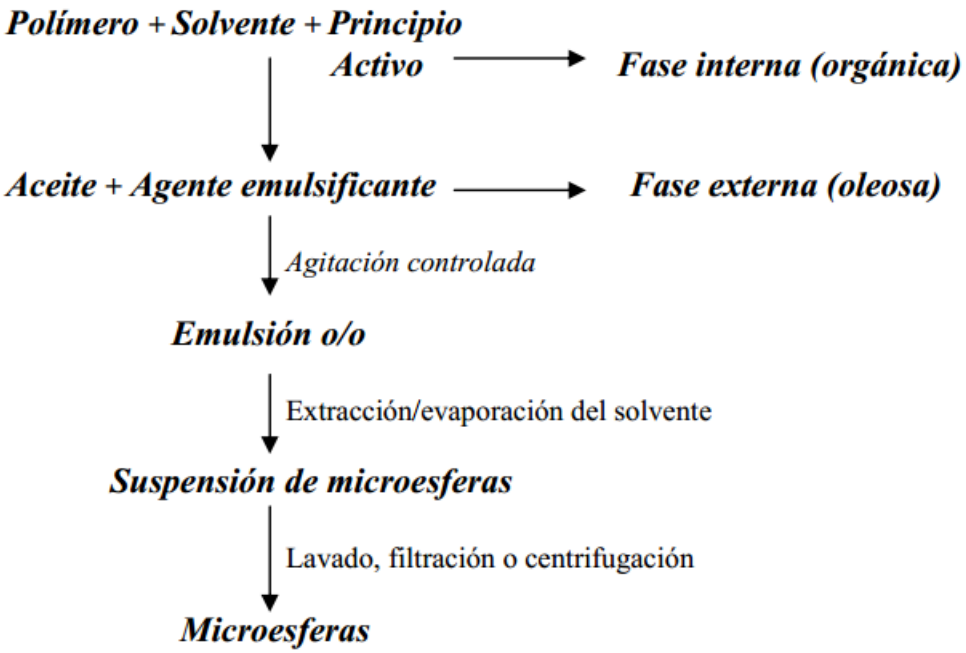

Figura 1.7 Método de emulsión o/o

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

2.1. ORIGEN Y PUREZA DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS

En la siguiente tabla se encontrarán los reactivos a utilizar en este trabajo, tanto su pureza como proveedor.

Tabla 2 .1. Lista de reactivos utilizados

Reactivo	Pureza	Proveedor
N-isopropilacrilamida	97%	Aldrich
4,4-azobis ácido cianovalérico	98%	Aldrich
1,4 Diexano	99%	Aldrich
Acetona-d6	99.9%	Aldrich
Éter de petróleo	95%	Aldrich
Ditiobenzoato de bencilo	N.D.*	Sintetizado
Cloruro de metileno	Técnico	MEYER
Alcohol Metílico	Técnico	MEYER

* N.D = no se determinó

2.2. SÍNTESIS DE LA POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA) (PNIPAM)

En un matraz Schelenk, se introdujeron el monómero NIPAM, el indicador ACVA y el agente de transferencia ditiobenzoato de bencilo, se disolvieron con 1,4-dioxano al 75% (w/w).

Una vez disueltos los componentes la solución se sometió a ciclos de desgasificación para eliminar el oxígeno presente. Posteriormente se introdujo a un baño térmico a 60ºC por 20 horas. La reacción se muestra en la Figura 2.1.

La recuperación del polímero se realizó por precipitación, disolviendo la mezcla de reacción en acetona y precipitando en éter de petróleo, para eliminar los disolventes residuales se colocó en un liofilizador (Figura 2.2).

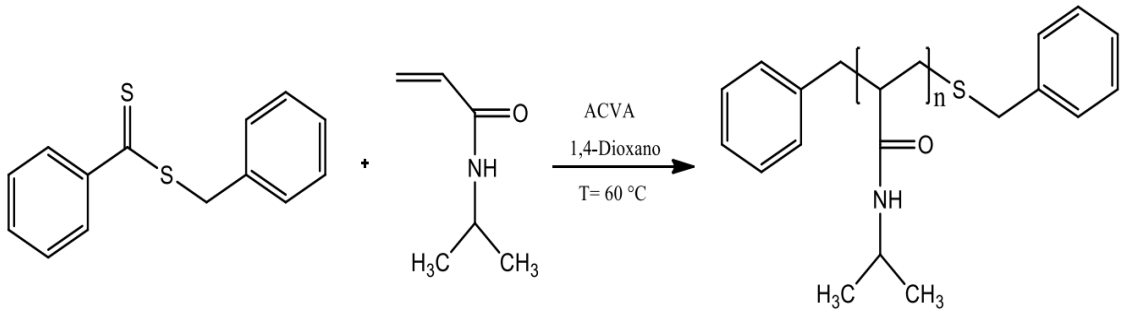

Figura 2.1. Representación esquemática para la obtención de Poli (N-isopropilacrilamida)

En la Figura 2.2 se puede observar algunos pasos para la elaboración de la PNIPAM.

a) Disolución de la mezcla de NIPAM, el indicador ACVA y el agente de transferencia Ditiobenzoato de bencilo, con agitación constante.
b) Mezcla homogenizada, sometida a desgasificación, en baño de agua fría.
c) Sistema de reacción a 60ºC.

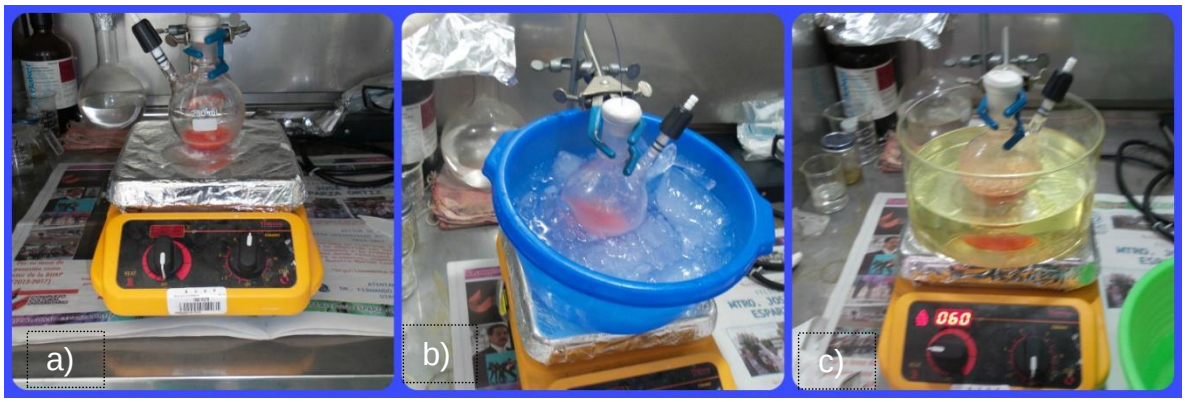

Figura 2.2 Sistema de reacción del homopolímero Poli(N-isopropilacrilamida).

2.3. MICROENCAPSULACIÓN

Las microcápsulas se prepararon a partir del polímero y la indometacina, en aceite mineral, diclorometano y hexano. Las concentraciones se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Cantidades correspondientes de PNIPAM e IMC, para la preparación de microcápsulas.

Microcápsula	PNIPAM	IMC
1	0.5gr	1.0gr
2	1.0gr	1.0gr
3	1.5gr	1.0gr

Los compuestos se introdujeron en un reactor con agitación constante por 4 horas, posteriormente se filtró la mezcla realizándole lavados con hexano, para la obtención de las microcápsulas. En la Figura 2.3 se puede observar algunos pasos para la elaboración de las microcápsulas.

a) Mezcla de PNIPAM, el fármaco IMC, aceite mineral, diclormetáno, a una agitación constante de 3485-3490 revoluciones por minuto.
b) Filtración de la mezcla con lavados de hexano, para la obtención de las microcápsulas.
c) Microcápsulas obtenidas.

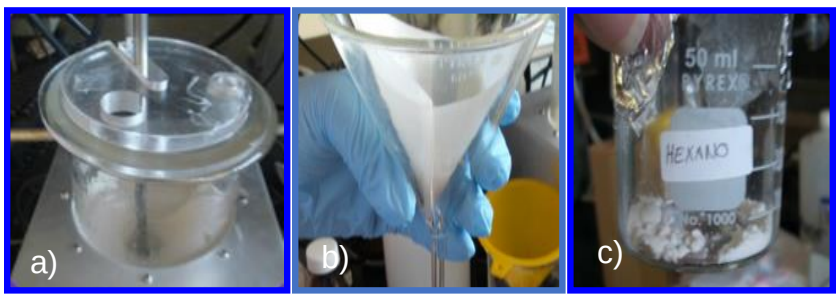

Figura 2.3. Microencapsulación de NIPAM+ IMC

2.4. ESPECIFICACIONES DE LOS EQUIPOS

2.4.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Es una técnica que se emplea para la determinación de estructuras moleculares orgánicas complejas. Se caracteriza por ser una de las técnicas principales para obtener información física, química y electrónica en la estructura de las moléculas [14,30].

El espectro de ^{1}H RMN se midieron con un espectrómetro JEOL Eclipse-300 MHz para líquidos. Se utilizó $CDCL_3$ (Cloroformo deuterado) como disolvente para el Ditiobenzoato de bencilo y el homopolímero PNIPAM con D_2O. La asignación de señales de espectros se confirmó por una simulación mediante el programa ChemDraw Ultra 8.0.

2.4.2. Cromatografía de permeación en gel (GPC).

La cromatografía de exclusión de tamaño o GPC es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para determinar la distribución del tamaño molecular de los polímeros de cualquier tipo.

El peso molecular experimental (Mn SEC) del polímero se determinó por GPC utilizando un instrumento Heweltt-Packard (HPLC serie 1100) equipado con detectores de luz UV e índice de refracción.

2.4.3. Reología.

Estudia la deformación y el flujo de los materiales sometidos a fuerzas externas. El objetivo de la reología está restringido a la observación del comportamiento de los materiales sometidos a deformaciones muy sencillas.

Las mediciones se realizaron en un réometro Rheolab QC, AntonPaar a diferentes temperaturas (10-60ºC). Se prepararon soluciones estándar al 4% en peso del homopolímero PNIPAM en agua tridestilada desionizada y puesta en agitación para garantizar una buena homogenización de la misma.

2.4.4. Turbidimetría.

Técnica utilizada para medir tanto el comportamiento de fase como la morfología y conformación de la cadena de polímero en una solución.

Las mediciones fueron realizadas en un turbidímetro Hach 2100 N a diferentes temperaturas (20-60ºC).

2.4.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La técnica se basa en los cambios de masa como resultado de una variación de temperatura o por someter un material a una temperatura establecida durante un periodo definido. Los cambios de masa identifiados permiten determinar bajo qué condiciones los materiales se descomponen. Los resultados se expresan gráfiamente a través de termogramas [30,31].

Se utilizó un equipo marca NETZSCH, con las especificaciones de valor de velocidad de 25K cada diez minutos, con una atmosfera formada por nitrógeno al 80% y aire 20%, teniendo de masa 96 mg a 103 mg.

2.4.6. Difracción de Rayos-X.

Es una técnica no destructiva y de las más importantes en la caracterización de los materiales cristalinos, cerámicos, polímeros, minerales, u otros compuestos orgánicos e inorgánicos [32].

La PNIPAM, IMC y microcápsulas fueron caracterizadas mediante difracción de Rayos-x usando un equipo marca BRUKER modelo D8 DISCOVER, para el método de polvos, con una Cu kα de 1.5401 Å, para 2θen el intervalo de 5 a 70° con un tamaño de paso 0.04° y un tiempo de paso de 5 s. La identificación fue realizada mediante el uso de un programa computacional que tiene por nombre EVA V.9.0

2.4.7. Microscopía Electrónica de Superficie (SEM).

Es una técnica de visualización, la cual ofrece imágenes de gran resolución y profundidad de campo, utilizando las interacciones electrón-materia [32].
Se utilizó un equipo marca JEOL modelo JSM6610 VL para observar morfología, este equipo también proporcionó información sobre la química de nuestro material sintetizado, por medio de la técnica EDS.

2.4.8. ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE.

Se utilizó un espectrofotómetro marca UV-Genesys 105 UV-VIS. Se midió la longitud de onda a una absorbancia máxima en 318nm, usando cloruro de metileno como blanco de ajuste.

2.5. VALORACIÓN

Para la valoración se compraron cápsulas comerciales de IMC se pesaron y se obtuvó el peso neto promedio. Se prepararon dos soluciones una conteniendo la NIPAM+IMC y otra sólo de IMC de referencia (SRef-FEUM). Obtener la absorbancia de referencia y de las microcápsulas, por medio de la siguiente ecuación [6].

$$concentración = CD\left(\frac{A_m}{A_{ref}}\right) \quad (1)$$

Donde:
C = Cantidad por mililitro de la preparación de referencia.
D = Factor de disolución de la muestra.
A_m = Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.
A_{ref} = Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

2.6. DISOLUTOR

El disolutor se operó a 37°C (temperatura corporal) con un baño térmico de agua. (ver Figura 2.4). Se colocarón 500mL de solución de SA de fosfatos (Fosfato monobásico de potasio Hidróxido de sodio) en cada reactor.

Se introdujeron 12.5mg en cada reactor de las microcápsulas 1, 2 y 3, al igual que la de SRef-FEUM de indometacina. Se tomó una muestra cada 15 min de cadareactor para poder realizar las mediciones de UV-visible.

Figura 2.4. Equipo disolutor con seis reactores

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La llamada tecnología de liberación sostenida y controlada ha adquirido gran importancia en diversos campos de investigación, tanto en el campo de la agricultura como en el de la farmacéutica, siendo su principal objetivo la liberación sostenida o controlada de un material activo desde una matriz orgánica al otro medio con el fin de conseguir sobre el mismo una acción determinada.

Con la aplicación de esta tecnología se busca aumentar la eficiencia del fármaco alargando su acción en el tiempo, contribuyendo así a la disminución de la toxicidad que puede generar en el cuerpo humano.

En el presente trabajo se realizó la microencapsulación de IMC con el polímero PNIPAM, formando las microcápsulas al aplicar la técnica de extracción evaporación del disolvente.

El polímero PNIPAM se caracterizó por RMN 1H, TGA-DSC, GPC. Se determinó la LSCT de sus soluciones acuosas por reometría y turdimetría.

Las microcápsulas de polímero-fármaco, se caracterizaron por DRX, DSC y SEM.

Las pruebas de valoración se hicieron en un disolutor, y la liberación se siguió por UV-Vis.

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PNIPAM

El polímero se caracterizó por resonancia magnética nuclear de proton, RMN 1H. Su espectro se muestra en la Figura 3.1.

En la cual se observan las señales características del polímero que son:

- El grupo isopropil en 1.1 ppm (**$\underline{CH_3}$**-CH-**$\underline{CH_3}$**) (a).
- En 1.50 ppm el grupo metileno (CH-**$\underline{CH_2}$**) (b).
- En 1.90 ppm el grupo metino (**$\underline{CH}$**-CH_2) (c).
- El protón del metino en 3.86 ppm del grupo isopropil (CH_3-**$\underline{CH}$**-CH_3) (d).
- En 7.3-8.0 ppm se observan los desplazamientos del agente de transferencia.

En 3.7 ppm se logra apreciar una disminución considerable del disolvente Dioxano, el cual se usó durante la etapa de síntesis, y que a diferencia del disolvente acetona éste fue removido casi por completo.

Entre 5.5 y 6 ppm se observa las señales de doble enlace C del monómero residual, esto se debe a que el bajo peso molecular del polímero impide una purificación rigurosa.

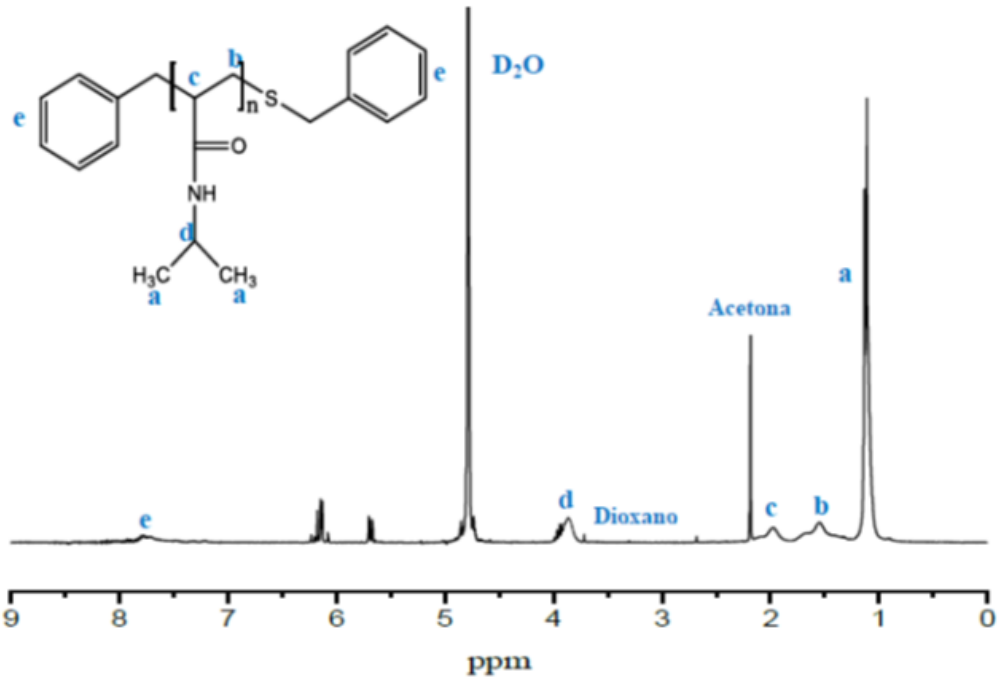

Figura 31. Espectro de RMN 1H de la PNIPAM en D_2O

3.1.1. ANÁLISIS TERMICO (TGA, DSC).

Para respaldar la información dada por RMN^{1}H, se evaluó la Tg de la PNIPAM. En la figura 3.2 se observa como las curvas de calor específico a presión constante y en función a la temperatura permiten localizar las temperaturas Tg, Tc, Tm y Td, en el termograma de la PNIPAM estas fueron determinadas de forma experimental,

siendo que la Tg = Temperatura de inflexión de la curva, Tc, Tm y Td se leen en los picos correspondientes exotérmico y endotérmico.

Se observa en 67.5ºC correspondiente al punto de fusión del monómero residual, 84ºC correspondiente a su transición vítrea (Tg) y 379ºC correspondiente al punto de fusión de la PNIPAM. En 122.5ºC corresponde a su temperatura de cristalización (Tc), y 471ºC se relaciona con la temperatura de degradación.

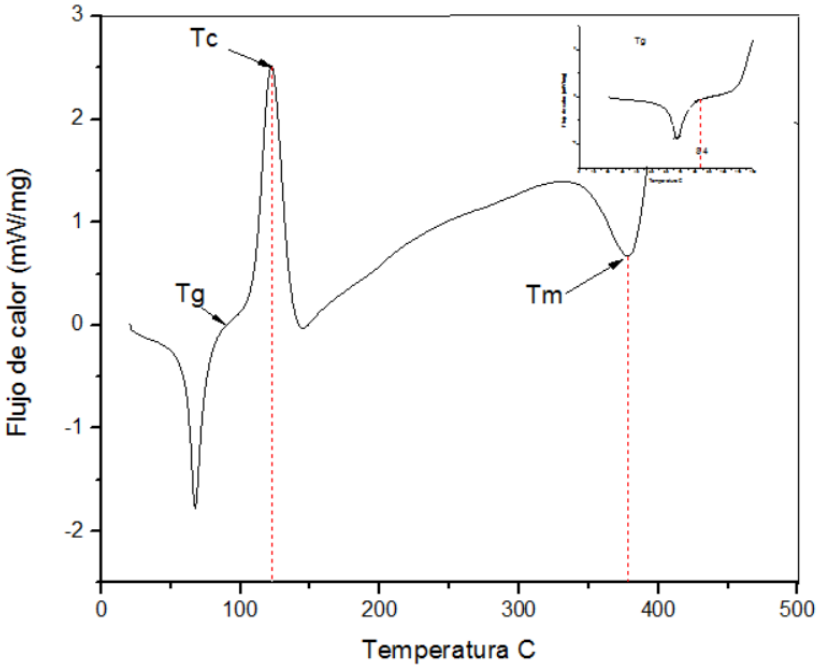

Figura 3.2. Termograma DSC correspondientes a la PNIPAM.

Como se puede observar en la Figura 3.3, la PNIPAM fue sometida a un calentamiento controlado continúo, utilizando una velocidad de calentamiento de la muestra de 25ºC por minuto. En la curva termogravimétrica (Figura 3.3a), obtenida se aprecian dos intervalos de pérdida de peso significativamente diferentes.

La temperatura de pérdida de peso en 136ºC y la temperatura de pérdida de peso en 380ºC se infiere que es donde inicia la descomposición del polímero. Las temperaturas de 136 y 380ºC, la pérdida de peso se asignó con la ayuda de la gráfica de la primera derivada del TGA (Figura3.3b).

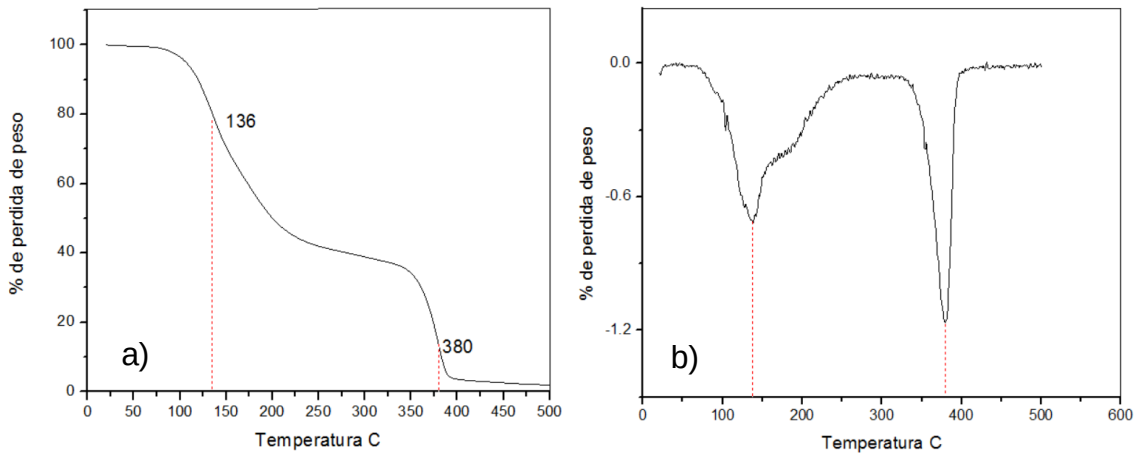

Figura 3.3. a) Termograma TGA correspondiente a la PNIPAM b) derivada TGA (Δm/ΔT vs T)

En la Figura 3.4 se muestra el cromatograma de la PNIPAM, en el cual se observa una curva unimodal, típico de una polimerización controlada. Así mismo en la Tabla 3.1, se presentan los valores del peso molecular obtenido por GPC fue de 5182 g/mol y el índice de polidipersidad de 1.47, que corresponde a los valores reportados para la polimerizción RAFT.

Por lo tanto indica que el agente de transferencia Ditiobenzoato de bencilo logró controlar el crecimiento de cadena.

Tabla 3.1. Datos obtenidos de GPC de PNIPAM

PNIPAM $_{26}$				
POLÍMERO	**Conv %**	**Mn (g/mol)**	**Mn SEC (g/mol)**	**PDI (Mw/Mn)**
PNIPAM$_{26}$	0.98	5182	2953	1.47

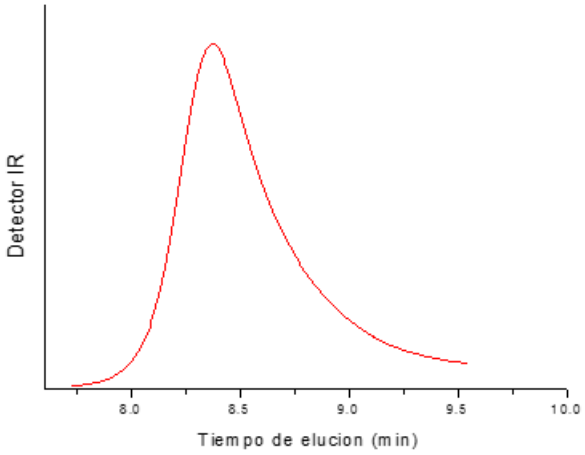

Figura 3.4. Cromatografia de PNIPAM

La LCST se determina por varias técnicas, entre ellas está reportada como un aumento de la viscosidad en función de la temperatura. En la figura 3.5 se presenta el graficó de la variación de la viscosidad en función de la temperatura que se realizó a la PNIPAM en solución acuosa, el análisis se realizó en un intervalo de temperaturas de 10 a 50ºC, observando que la transición de fase (LCST) comienza en 25ºC y no a 32ºC, como se ha reportado. Por lo que esto puede ser atribuido a los grupos bencilos pertenecientes al agente de transferencia.

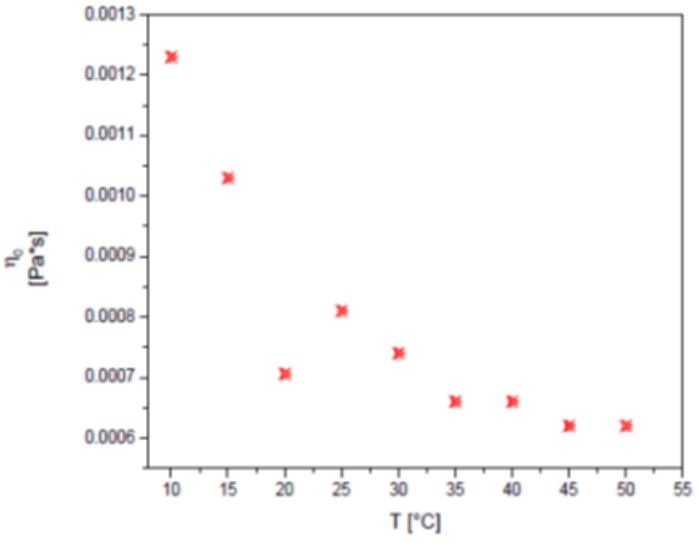

Figura 3.5. Viscosidad contra temperatura de PNIPAM.

Otra técnica para la determinación es turbidimetría, precisamente para medir el cambio de turbidez, asociada a la LCST.

En la figura 3.6 se presenta el gráfico de turbidimetría de la PNIPAM, realizado en un intervalo de temperaturas de 20 a 45ºC. Con el fin de corroborar lo analizado por reología, se puede observar que la turbidez aumenta con el incremento de la temperatura y el cambio en la LCST se da mucho antes de los 32ºC, es decir, el cambio de fase ocurre a 25ºC.

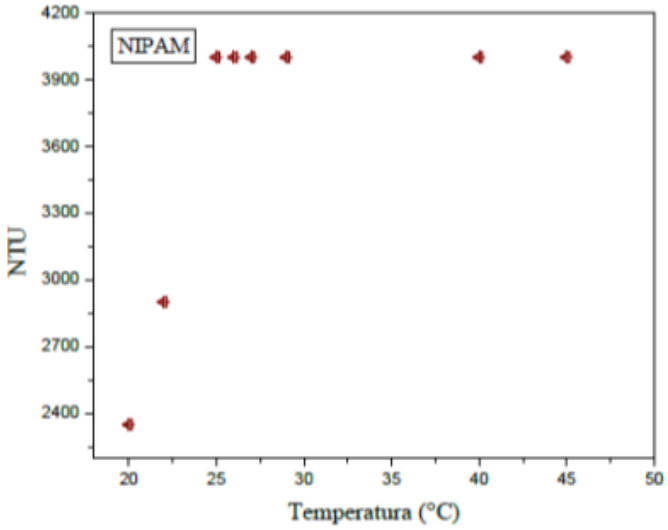

Figura 3.6. Variación de la turbidez en función de la temperatura de PNIPAM

3.1.2. DRX.

El difractograma de la Figura 3.7 nos muestra que el polímero es cristalino y da cinco señales intensas, en 14.34, 16, 21.55, 22.5 y 22.72 θ. Esto coincide con la carta cristalográfica de la polinipam.

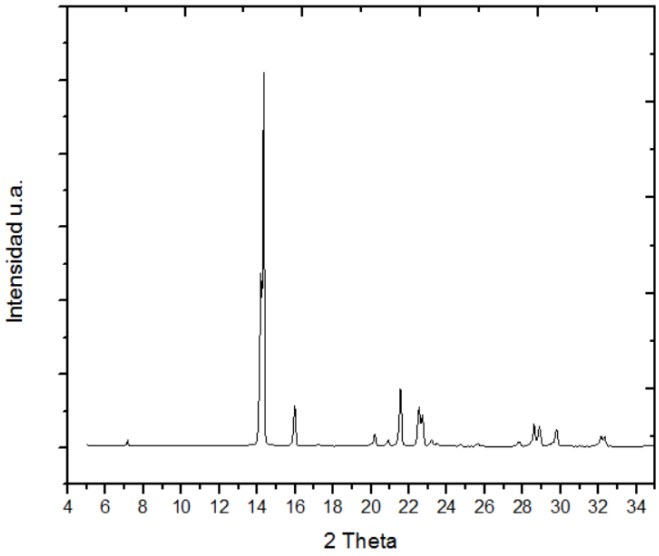

Figura 3.7. Difragtograma de la PNIPAM

3.1.3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

La técnica nos proporciona información morfológica y formológica de las superficies de las mismas. Así en la figura 3.8 se observa una superficie homogénea y sobre ella partículas con forma que tiende a ser esférica, típicas de la PNIPAM.

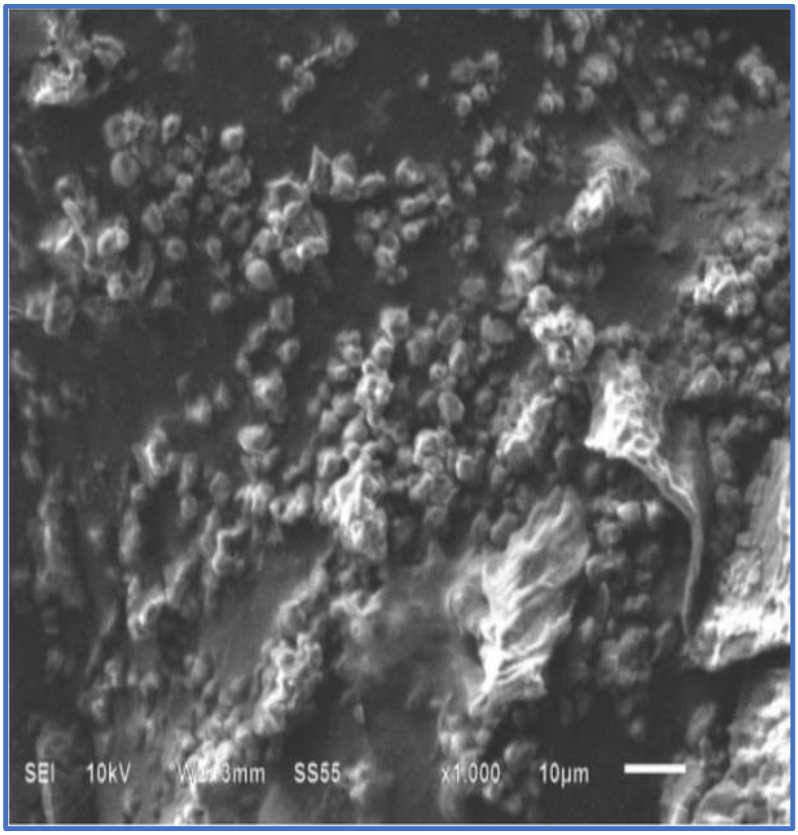

Figura 3.8. SEM de PNIPAM

3.2. CARACTERIZACIÓN DE IMC

3.2.1. ANÁLISIS TÉRMICO (TGA, DSC).

En el análisis termogravimétrico (Figura 3.9a) para la IMC muestra que el inicio de pérdida de peso fue a 300ºC. La temperatura a 300ºC se asignó con la ayuda de la gráfica de la primera derivada del TGA se da lectura a la temperatura donde coincide el primer pico de pérdida de peso, como se observa en la figura 3.9b.

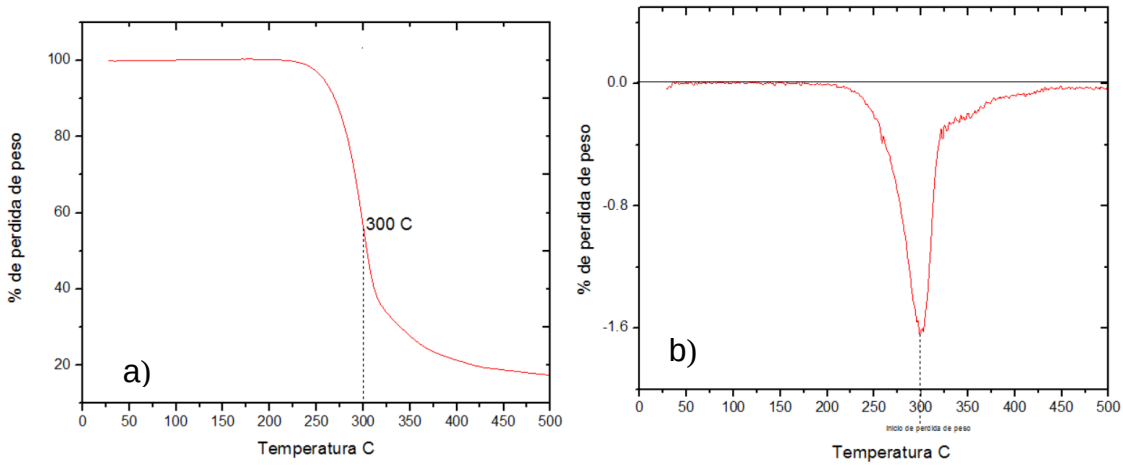

Figura 3.9 a) Termograma TGA correspondiente a la IMC b) derivada TGA (Δm/ΔT vs T)

En la curva DSC (Figura 3.10) de IMC, se observan en 162ºC correspondiente a su temperatura de fusión, la cual corresponde a la temperatura reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para dicho fármaco.

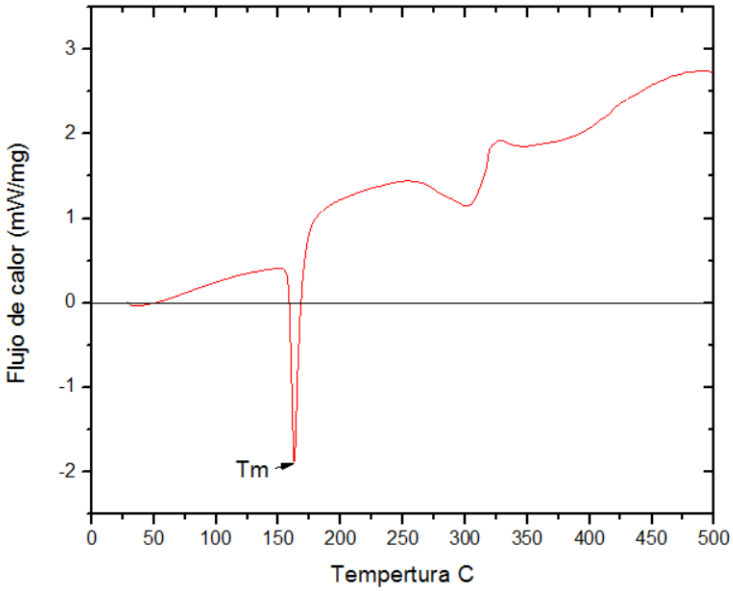

Figura 3.10. Termograma DSC correspondientes a la IMC

3.2.2. DRX.

El difractograma de la figura 3.11 nos muestra que el fármaco es cristalino y da señales en 10, 12, 13, 17, 18, 20 y 27.

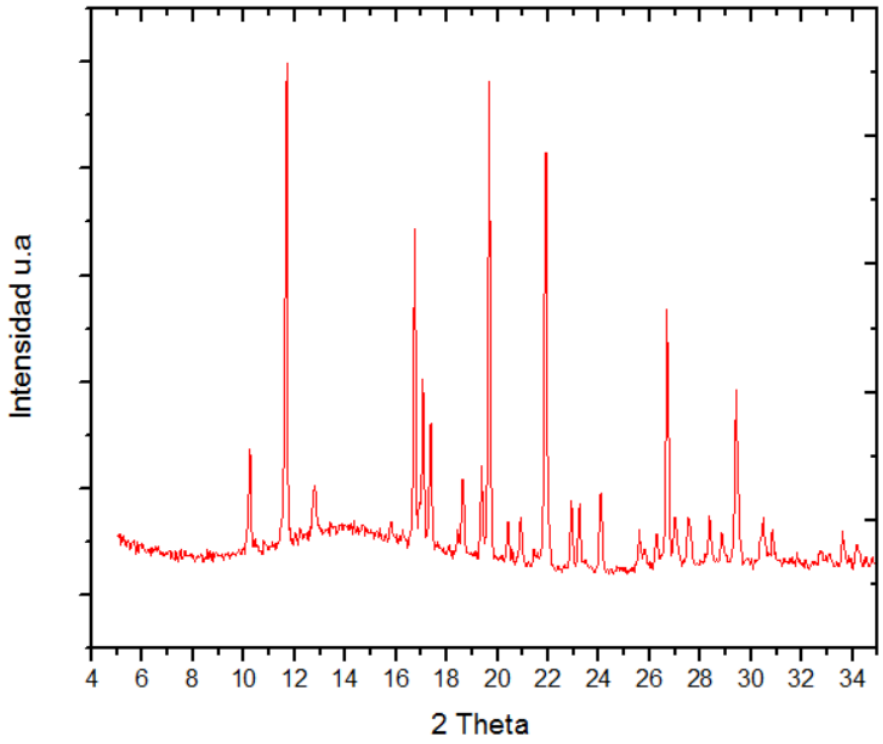

Figura 3.11. Difractograma de IMC

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS

3.3.1. ANÁLISIS TÉRMICO (TGA, DSC).

Se calcularon los porcentajes de pérdida de masa para la microcápsula 1, esto método se utilizó para las microcápsulas 2 y 3, que éstas se encuentran conformadas por diferentes gramos de PNIPAM, recordando la tabla 2.2, donde se especifican los gramos que son utilizados para cada microcápsula.

Para la microcápsula 1, como se observa en la Figura 3.12, indica que la temperatura de pérdida de peso es en 311ºC, con un 70% de pérdida de peso. La temperatura se asignó con la ayuda de la gráfica de la primera derivada del TGA, se da lectura a la temperatura donde coincide con el primer pico, como se observa en la Figura 3.12 b), posteriormente en el termograma TGA se localiza la temperatura y se traza una línea vertical hasta donde se intersecta con la línea de la microcápsula, se traza una segunda línea horizontal para calcular la pérdida de peso con una resta (100-30=70% de pérdida de peso).

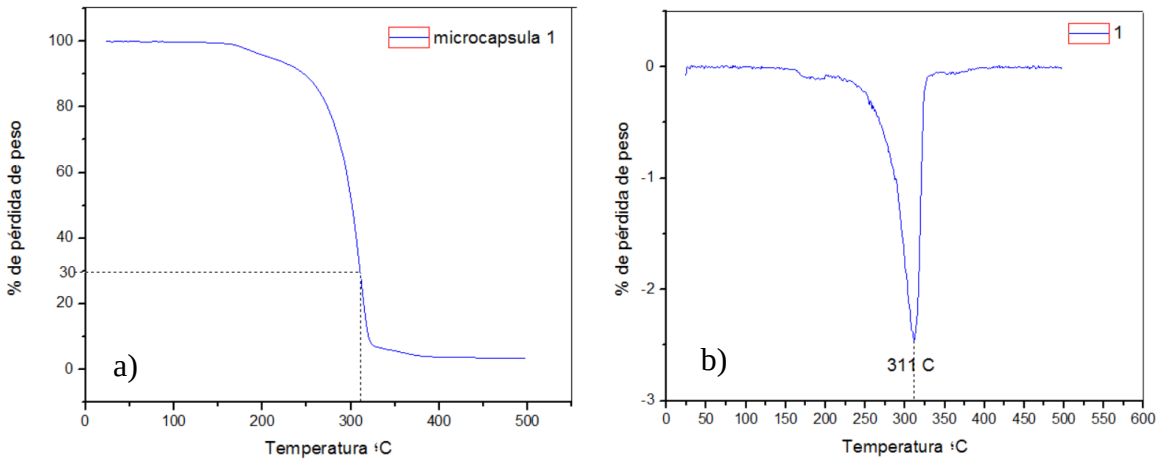

Figura 3.12. a) Termograma TGA para la microcápsula 1, b) primera derivada del TGA

En la curva termogravimétrica Figura 3.13 de la microcápsula 2, obtenida se aprecian tres intervalos de pérdida de masa significativamente diferentes en 105ºC, 315ºC y 406ºC. El primer intervalo tiene 3% de pérdida de peso, el segundo intervalo 46% y 43% de pérdida de peso.

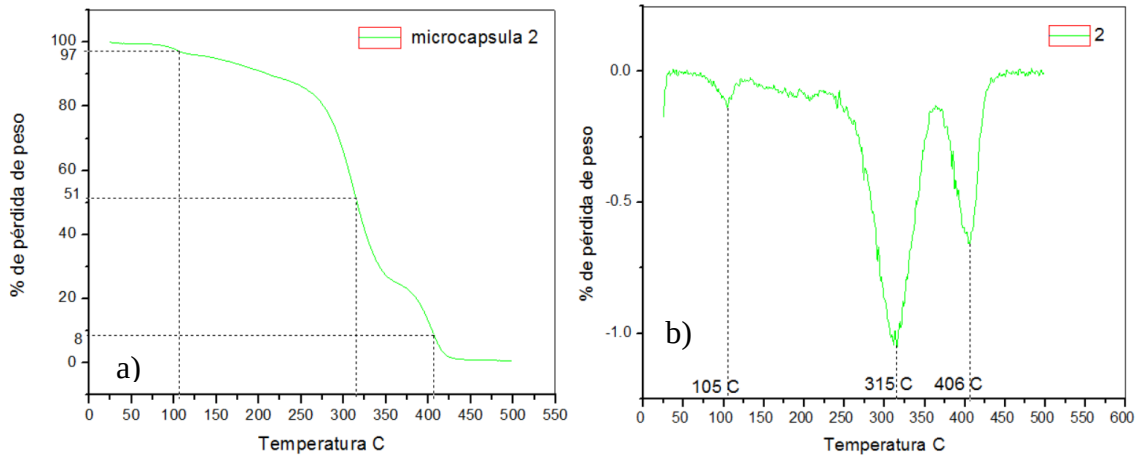

Figura 3.13. a) Termograma TGA para la microcápsula 2, b) primera derivada del TGA

La microcápsula 3 Figura 3.14, se aprecian dos intervalos de pérdida de masa significativamente diferentes en 106ºC y 315ºC.

En el primer intervalo tiene 2% de pérdida de peso, el segundo intervalo 54% de pérdida de peso.

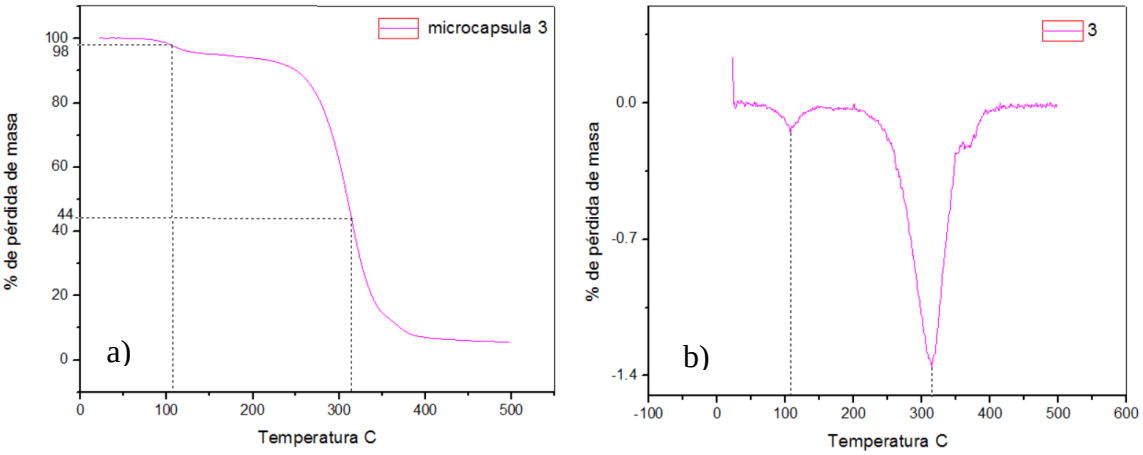

Figura 3.14. a) Termograma TGA para la microcápsula 3, b) primera derivada del TGA

Por otra parte, en el termograma DSC para la microcápsula 1 (Figura 3.15) se observa que es parecida al termograma de la IMC, encontrándose su temperatura

de fusión en 161ºC, lo cual está dentro del intervalo de temperatura de fusión de la IMC, sin observar alguna señal que corresponda a la PNIPAM, (ver figura 3.10)

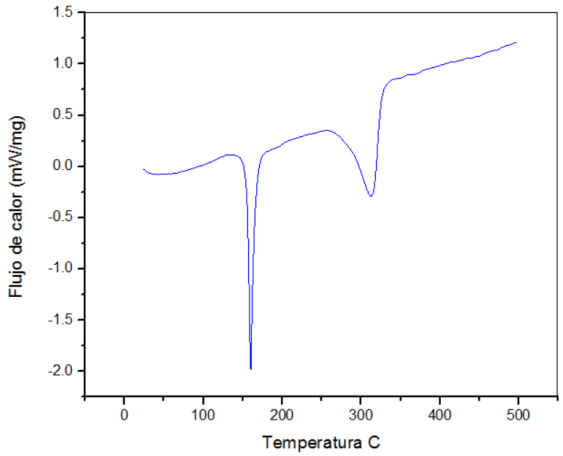

Figura 3.15 Termograma DSC correspondientes a la microcápsula1.

Por otro lado, en el resultado de la microcápsula 2 (Figura 3.16), se determinaron las temperaturas Tg, Tc, Tm de forma experimental, Tg = Temperatura de inflexión de la curva, Tc y Tm se leen en los picos correspondientes exotérmico y endotérmico. La microcápsula muestra una Tg de 81ºC, una temperatura de cristalización de 105ºC, con una temperatura de fusión de 150ºC que es aproximadamente a la temperatura de fusión de la IMC.

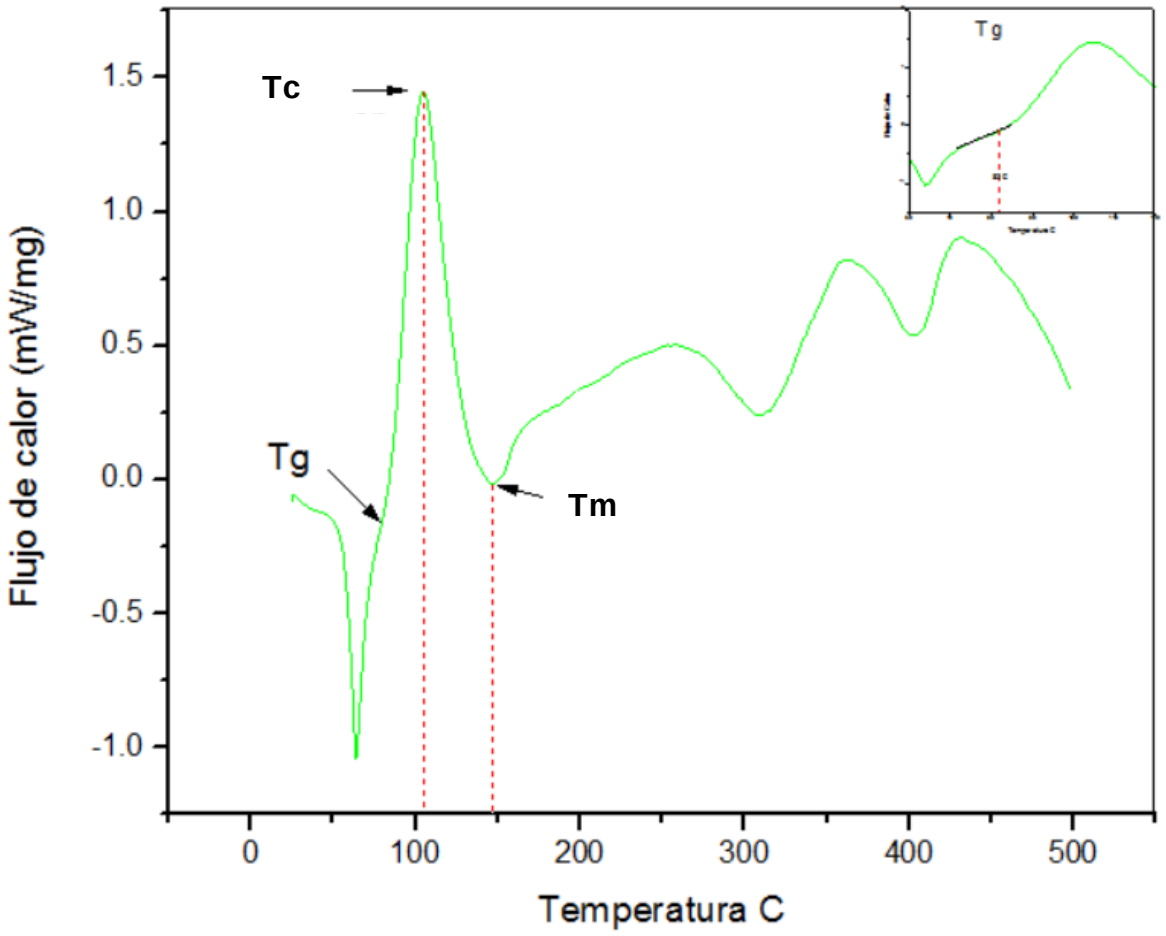

Figura 3.16. Termograma DSC para la microcápsula 2

Finalmente en la en la microcápsula 3 (Figura 3.17), muestra su temperatura Tg de 89ºC una temperatura de cristalización de 107ºC y su temperatura de fusión en 158ºC.

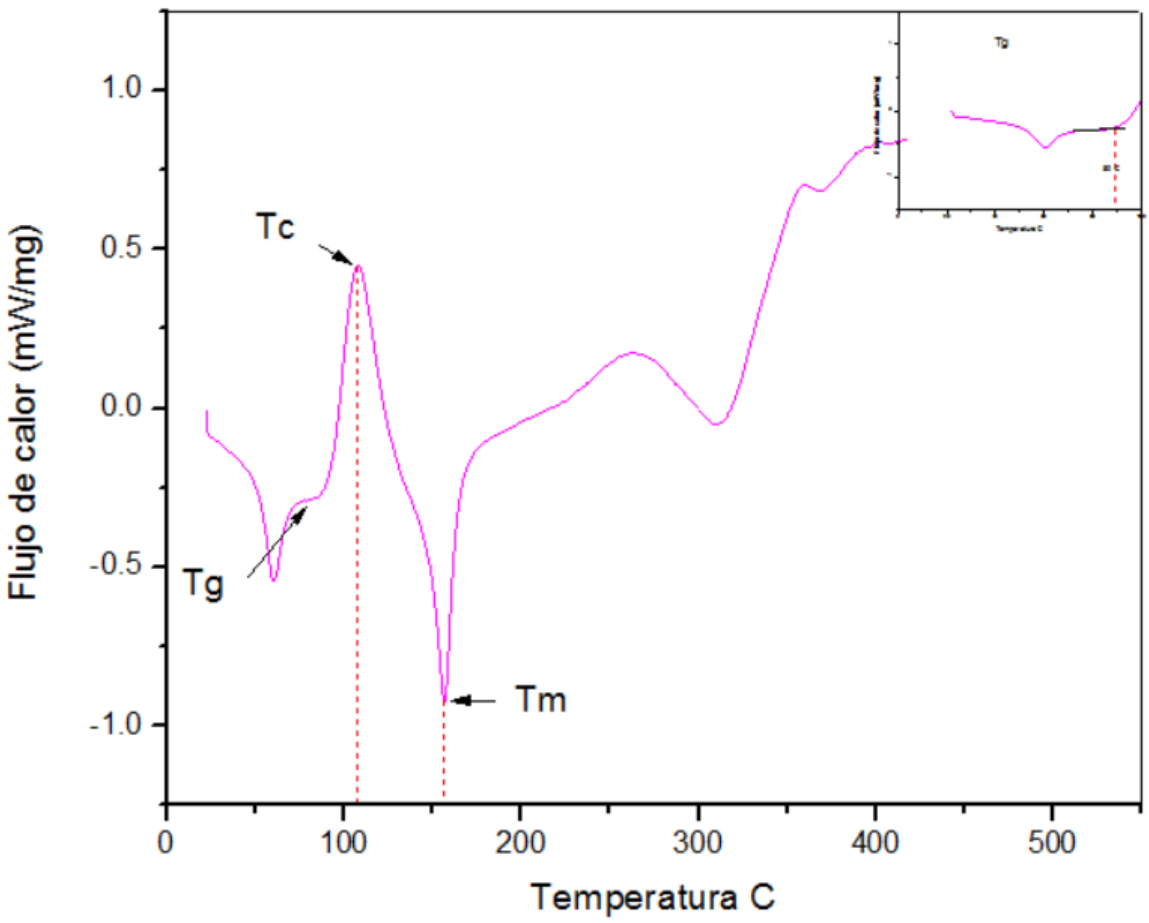

Figura 3.17. Termograma DSC de la microcápsula 3.

3.3.2. DRX.

En la figura 3.18 se pueden observar los tres difractogramas correspondientes de cada microcápsula realizada, observando los picos correspondientes a la PNIPAM e IMC determinando que ambos son cristalinos.

El polímero muestra señales prácticamente en los tres difractogramas de las 3 microcápsulas, siendo de mayor intensidad en las microcápsulas 2 y 3, por lo que se deduce que la PNIPAM si encapsula al fármaco, aunque también muestra señales del mismo fármaco. Por lo cual se puede inferir que una parte del fármaco es encapsulada y otra parte de él queda en la superficie.

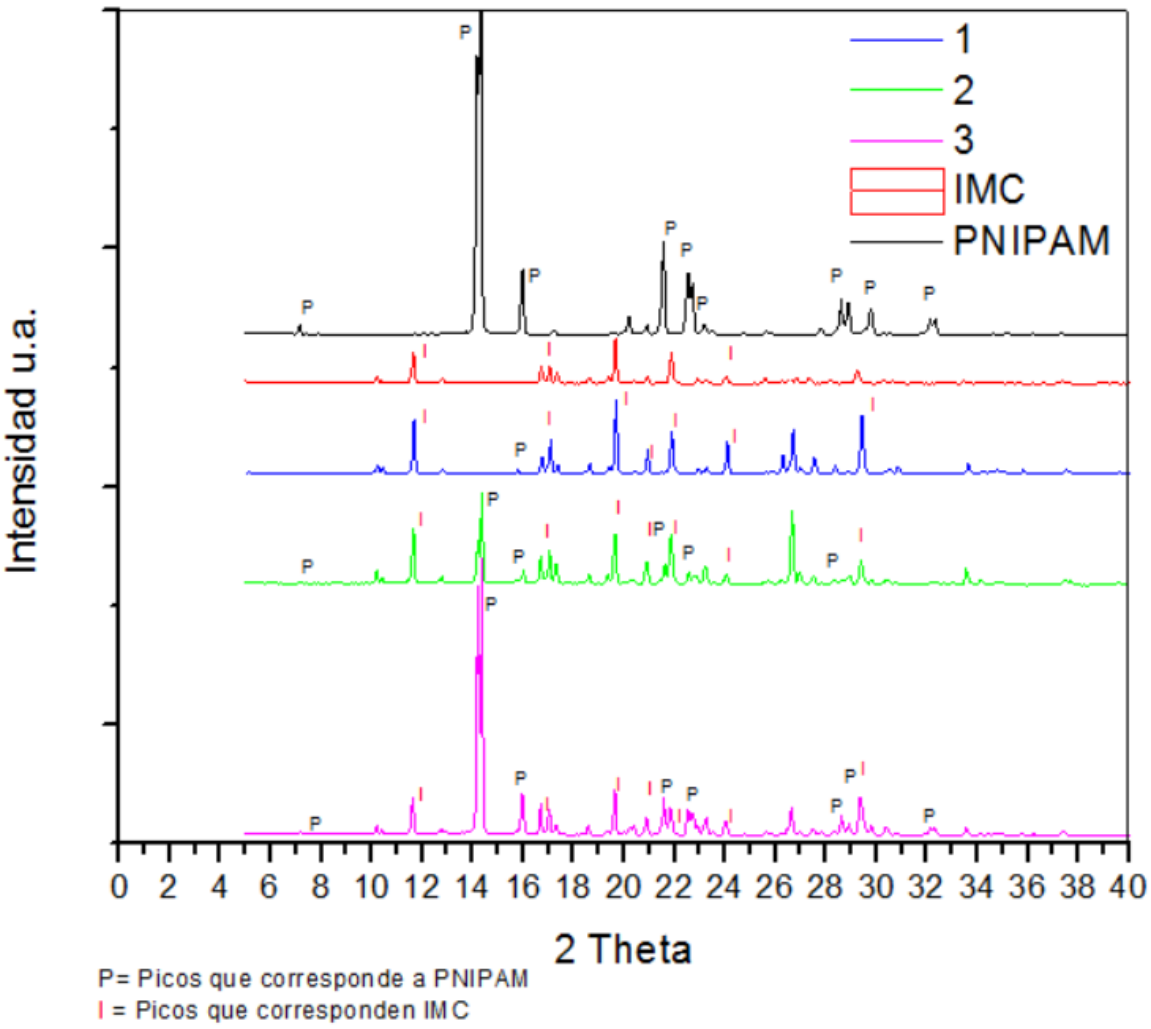

Figura 3.18. Difractograma correspondiente a cada microcápsula y materia prima.

3.3.3. SEM.

Como se observa en la Figura 3.19 correspondiente a la microcápsula 1 tiene una superficie rugosa y como se muestra en el c) no tienen una forma definida, con poros aproximadamente 4.2, 7.1 y 10µm.

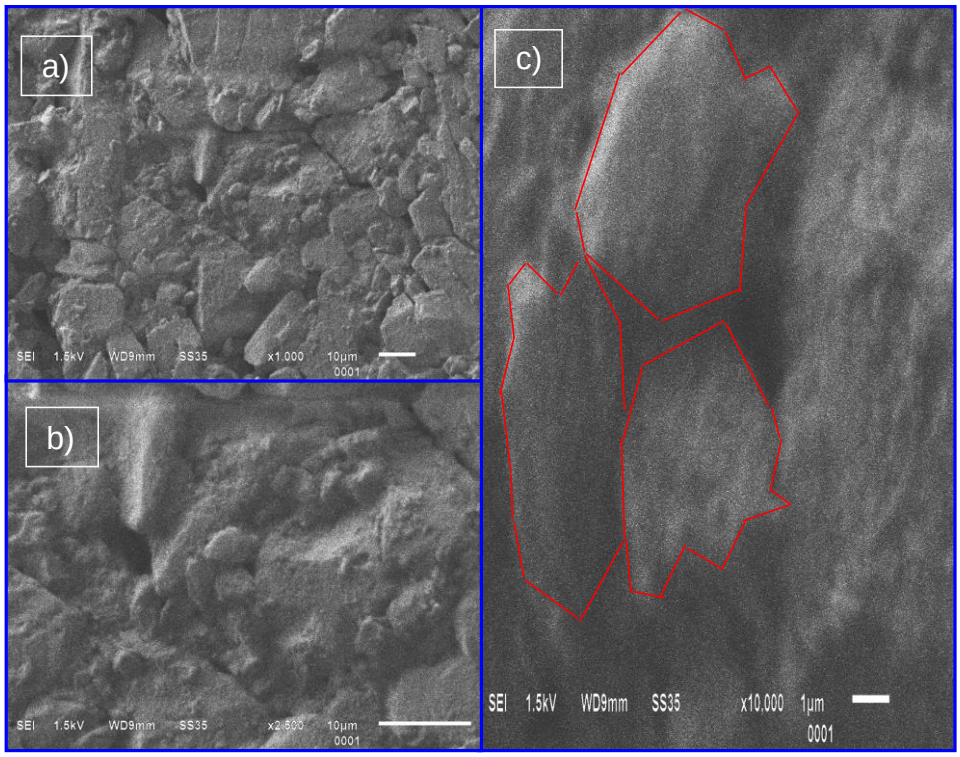

Figura 3.19. SEM de la muestra 1 (.5gr PNIPAM + 1gr IMC)

En la Figura 3.20a, se observa que la microcápsula 2 es rugosa con poros de aproximadamente 12, 8 y 4µm. En el inciso b) se observan estructuras parecidas a polígonos irregulares con tamaños aproximados a 19µm.

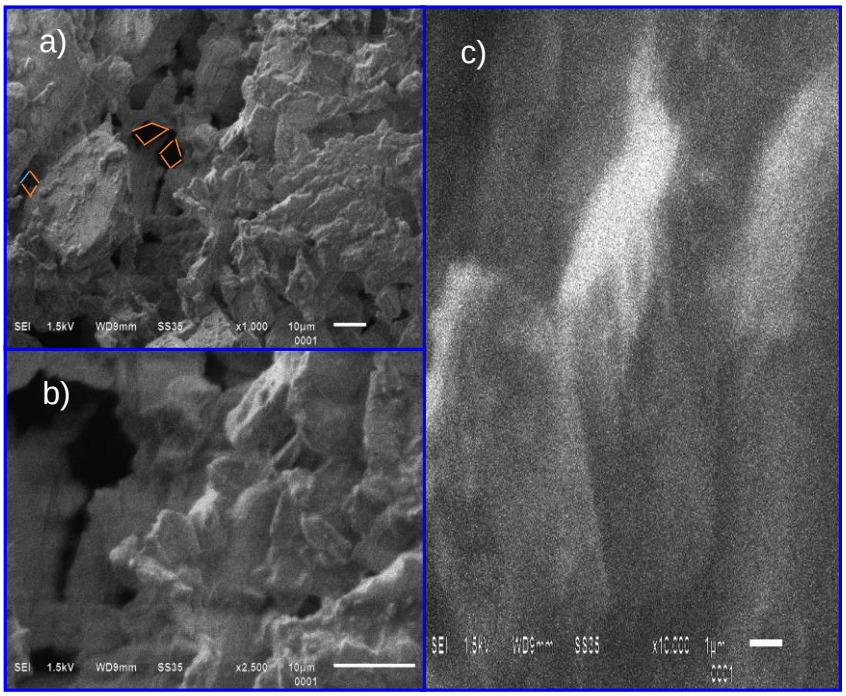

Figura 3.20. SEM de la muestra 2 (1gr PNIPAM + 1gr IMC)

Para la última microcápsula 3 Figura 3.21a, se observa que no hay una forma definida, pero muestra una cierta homogeneidad en el tamaño con perímetros de aproximadamente 23µm. En la figura 3.21c se observa límites bien definidos de las microcápsulas.

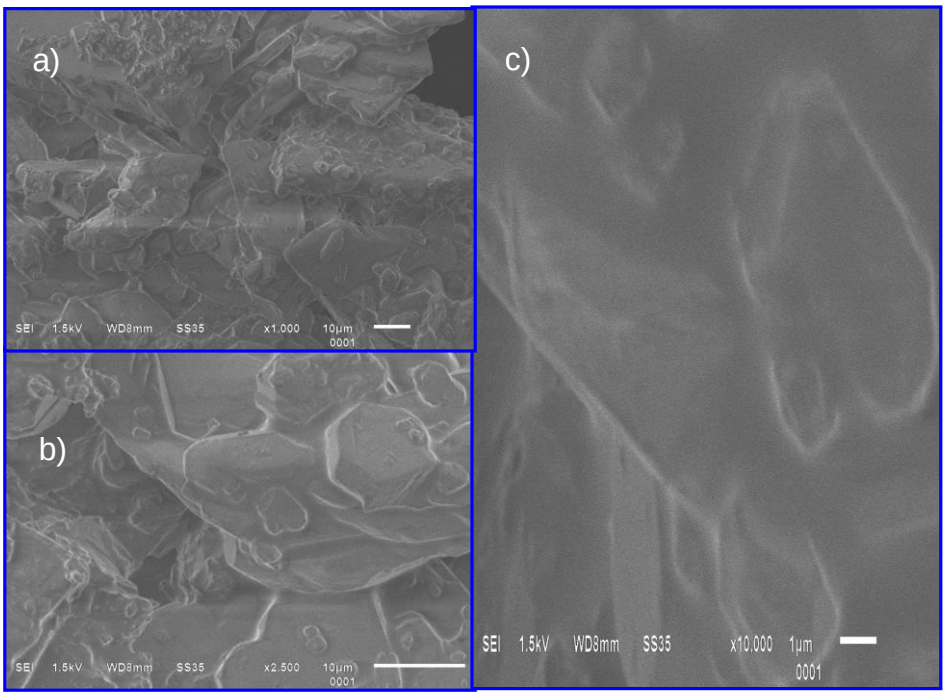

Figura 3.21. SEM de la muestra 3 (1.5 gr PNIPAM + 1gr IMC).

3.4. CUANTIFICACIÓN DEL FÁRMACO

La prueba de disolución de las microcápsulas se realizó con el equipo 1 de paletas que marca la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM =10ª edición de acuerdo al apartado para indometacina), en esta prueba se observa la cantidad de fármaco que se va liberando, aplicándola para las tres diferentes microcápsulas que se prepararon tomando en cuenta el estándar de referencia que sugiere la técnica, así mismo también la ecuación 1, para determinar la concentración del fármaco que se liberó en cada tiempo.

La liberación del fármaco, se siguió tomando alícuotas y midiéndolas en el espectrofotómetro de UV-Vis, ver Figura 3.22, permitiendo establecer a través de sus espectros de absorción en la región uv que se produce un desplazamiento del máximo de absorción para la IMC de referencia, cápsula comercial y las microcápsulas, el máximo se presenta entre 318 y 339 nm. Asimismo, las

microcápsulas poseen la ventaja de tener una mayor intensidad en su máximo de absorción.

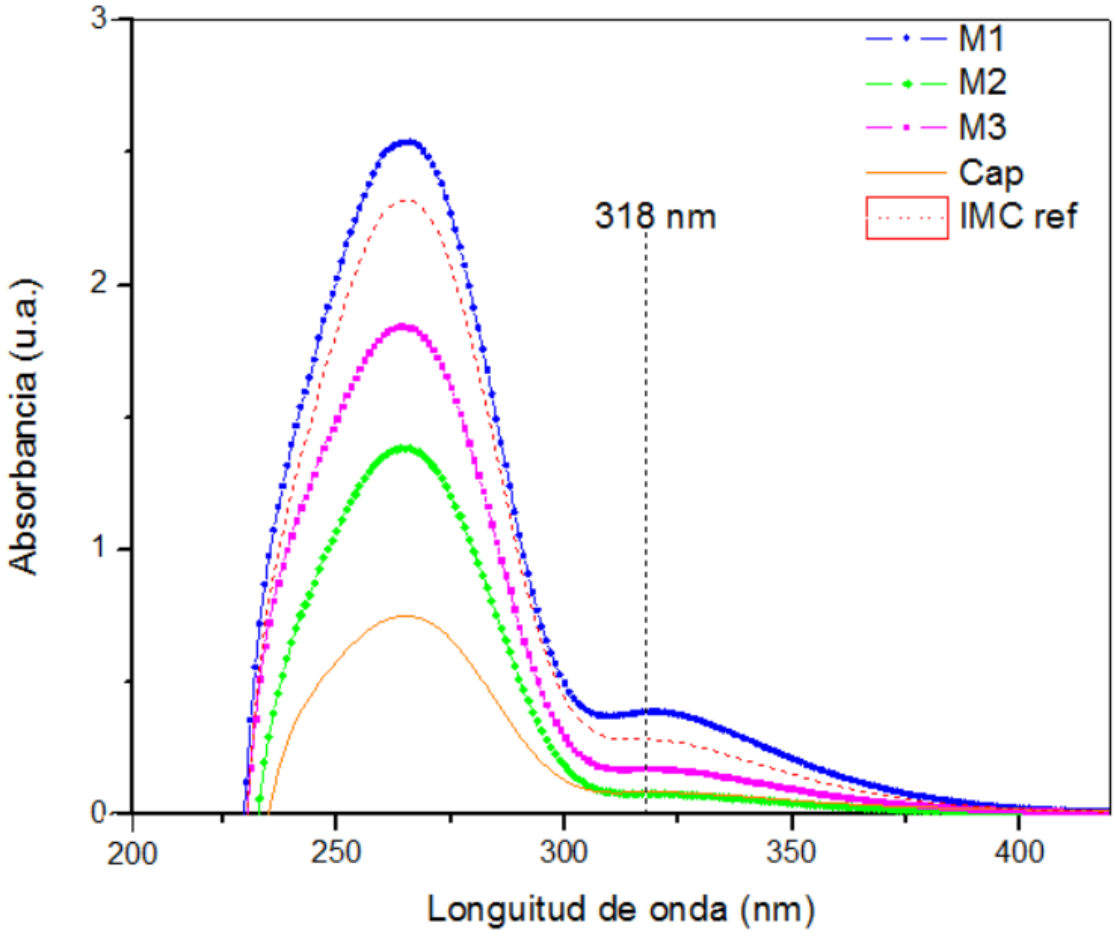

Figura 3.22. Espectros de absorción de UV de la IMC de referencia, Cápsulas comerciales y microcápsulas al minuto 15

En la Tabla 3.2 se muestran los valores de la concentración obtenidos a partir de la fórmula que reporta la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, tomando todos a la longitud de onda en 318nm, en los diferentes tiempos, para obtener los perfiles de liberación de las microcápsulas.

En la Figura 3.23 se observan los perfiles de liberación que tuvo cada una de las microcápsulas, cabe mencionar que se realizaron por triplicado las pruebas, como

se puede observar las tres tienen una mayor liberación del fármaco que la cápsula comercial.

- Microcápsula 1 (línea azul): se observa que del minuto 15 a 30 hay un aumento de concentración del fármaco, después del minuto 45 baja sustancialmente.
- Microcápsula 2 (línea verde): se observa que del minuto 15 a 30 hay una mayor concentración, después de éste tiende a disminuir hasta el minuto 45, del minuto 45 a 60 tiene un perfil de liberación uniforme y da un comportamiento constante de la liberación de la IMC.
- La microcápsula 3 (línea rosa): se observa que del minuto 15 a 30 hay una mayor concentración, después de éste tiende a disminuir continuamente hasta que llega al minuto 60. Es decir, no presenta cambios tan abruptos en la concentración con respecto al tiempo.

Por los resultados obtenidos de la figura 3.23, se observa que la microcápsula 2 (línea verde) tiene un comportamiento constante en la liberación del fármaco, ya que su gráfica muestra que la absorción de la microcápsula no se detiene abruptamente cuando alcanza la máxima concentración, sino que posee una curvatura permitiéndole quedar un tiempo sobre el nivel terapéutico. Incluso se infiere que si se hubiera continuado más tiempo con la prueba el gráfico de dicha microcápsula se hubiera mantenido sostenida la liberación.

Tabla 3.2. Valores de concentración.

a) Día 1									
Tiempo (min)	Referencia	Microcápsula 1		Microcápsula 2		Microcápsula 3		Capsula comercial	
	Absorbancia	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración
15	0.286	0.3896	42.57	0.0785	8.58	0.1753	19.15	0.086	9.40
30	0.135	0.3493	80.86	0.0649	15.02	0.1092	25.28	0.0654	15.14
45	0.1712	0.4068	74.26	0.0943	17.21	0.1199	21.89	0.0625	11.41
60	0.2515	0.4435	55.11	0.1202	14.94	0.1367	16.99	0.0646	8.03
b) Día 2									
Tiempo (min)	Referencia	Microcápsula 1		Microcápsula 2		Microcápsula 3		Capsula comercial	
	Absorbancia	Absorbancia	Concentracion	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración
15	0.286	0.1696	18.53	0.0925	10.11	0.101	11.04	0.0451	4.93
30	0.135	0.2741	63.45	0.1337	30.95	0.1151	26.64	0.0399	9.24
45	0.1712	0.3385	61.79	0.1763	32.18	0.1566	28.58	0.0372	6.79
60	0.2515	0.3738	46.45	0.2137	26.55	0.1979	24.59	0.0358	4.45
c) Día 3									
Tiempo (min)	Referencia	Microcápsula 1		Microcápsula 2		Microcápsula 3		Capsula comercial	
	Absorbancia	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia	Concentración
15	0.286	0.1417	15.48	0.0443	4.84	0.1099	12.01	0.0152	1.6608
30	0.135	0.2553	59.10	0.0776	17.96	0.189	43.75	0.0097	2.2454
45	0.1712	0.307	56.04	0.0762	13.91	0.1733	31.63	0.0151	2.7563
60	0.2515	0.3449	42.86	0.0944	11.73	0.2106	26.17	0.0191	2.3733

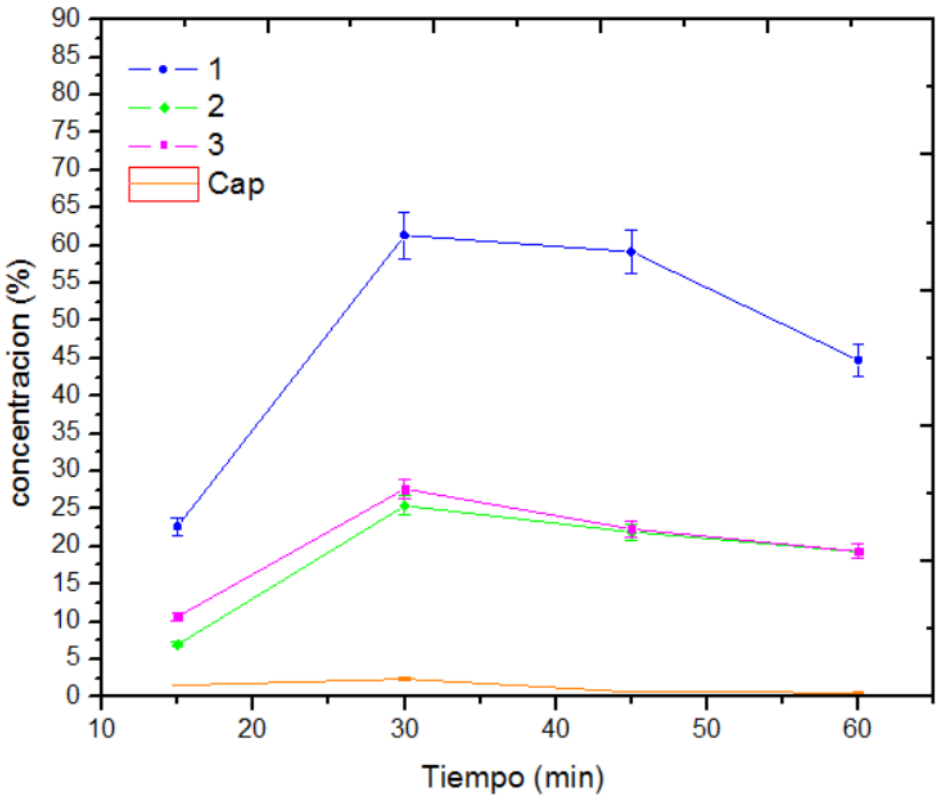

Figura 3.23. Variación de la concentración en función al tiempo

Si bien se observa, hay un comportamiento constante en la concentración en función del tiempo para las microcapsulas 2 y 3. Sin embargo, estas apenas alcanzan el 25% de liberación, al contrario la microcápsula 1, alcanza aproximadamente un 65% en su máximo y se reduce al 50% a los 60 min. Por lo que si se quiere una liberación constante la más adecuada es recomendar el uso de las microcapsulas 2 y 3, pero si se quiere mayor concentración del fármaco es preferible usar la microcápsula 1.

En cualquier caso, las microcapsulas 1, 2 y 3 están por arriba de la cápsula comercial.

CONCLUSIONES

- Se sintetizó el polímero poli(N-isopropilacrilamida) por polimerización RAFT, usando como agente de transferencia ditiobenzoato de bencilo, la PNIPAM presentó una temperatura de transición vítrea de 84ºC, la cual corresponde al valor reportado, al igual que el difractograma coincide con la carta cristalográfica de la PNIPAM.

- Se prepararon tres diferentes microcápsulas variando la concentración del polímero, para la microcápsula 1; (0.5/1), de los resultados obtenidos en DRX se infiere que el fármaco es el que esta microencapsulando al polímero, ya que este presenta mayor cantidad de picos correspondientes a la IMC. En las transiciones del termograma de la microcápsula 2 y 3 presentan una similitud en los resultados, sin embargo en DRX difieren ya que la microcápsula 2 tiene picos tanto de la PNIPAM como de la IMC y la microcápsula 3 muestra más picos que coinciden con la PNIPAM.

- En los resultados del SEM, se observa que las microcápsulas no tienen una forma definida.

- En la cuantificación del fármaco se muestra que las microcápsulas preparadas tienen una mayor concentración en función del tiempo que la cápsula comercial. La microcápsula 2 es la que indica tener un perfil más uniforme, ya que esta no presenta cambios tan abruptos, por lo tanto la microcápsula 2 es la que se propone para una liberación sostenida. El resultado de nuestro microencapsulado pertenece a un multinuclear irregular.

- La aplicación del polímero poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) sintetizado por polimerización RAFT como transportador del fármaco IMC para su liberación controlada incidió positivamente ya que se obtuvo el resultado esperado, dado que en la valoración del fármaco, las microcápsulas tienen una mayor concentración en las pruebas que las cápsulas comerciales.

TRABAJO FUTURO

Como continuación del trabajo desarrollado en esta tesis, es el estudio de las microcápsulas con un tiempo de valoración mayor a 1 hora. También sería importante evaluar la toxicología de las microcápsulas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moreno Cerezo, J.M. *Nuevos diseños galénicos de comprimidos de indometacina y tetraciclina con agentes hidrotrópicos y de inclusión para mejorar la velocidad de disolución y su solubilidad*, Tesis Doctoral, Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica 2004, Universidad complutense de Madrid: Madrid. p. 442.
2. López Ginés, G. *Diseño de formas farmacéuticas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor*, Tesis Doctoral, Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica 2008, Universidad de Granada: Granada. p. 331.
3. Sáez, V., Hernández, E., López, L. *Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas.* Revista Iberoamericana de Polímeros, 2003. 4(2): p. 111-122.
4. Andreetta, A.H., *Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos.* Lat. Am. J. Pharm, 2003. 22(4): p. 355-363
5. Viveros Nava, E.L. *Síntesis y caracterización del copolímero tribloque termosensible POLI (DAM-b-NIPAM-b-AM)*, Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería Química 2012, BUAP: Puebla. p. 87.
6. Cantillo Dueñas, E.A., Estudio fisicoquímico de la solubilidad de indometacina en mezclas etanol + propilenoglicol, Tesis para Magister en Ciencias Farmacéuticas, 2014. Universidad nacional de Colombia: Bogotá. p. 67.
7. México Secretaria de salud. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, edecima edición 2011, 2(1): p. 1376.
8. Pineda Peña, E.A., Evaluación del efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoíco) en el daño gástrico inducido por indometacina, Tesis de Maestría en Ciencias en biomedicina molecular, 2013. Instituto Politécnico Nacional. p. 77

9. Ortega Rodríguez, L.E., Homopolimerización de estireno y metacrilato de metilo en masa, controlada por agente RAFT. Tesis de Licenciado, Ingeniero químico, 2009. Universidad veracruzana: Coatzacoalcos.
10. Suaréz Schneider, G., *Obtención de micro y nano hidrogeles termosensibles en base a poli (N-isopropilacrilamida) y alginato*, Tesis de Licenciado, Licenciatura química 2012, Universidad simón bolívar: Sarrenejas. p. 107.
11. Palomino, K., Suarez-Meraz, K.A.Microstructured poly(N-isopropylacrilamide) hydrogels with fast temperature response for pulsatile drug delivery. Springer, 2015: p.9.
12. Escobar, J.L., et al., *Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2002. 3(3): p. 25.
13. Cai, S., Sou, Z., *Mechanics and chemical thermodynamics of phase transition in temperature-sensitive hydrogels*. Elsevier, 2011. p. 2259-2278.
14. Delgadillo Pérez, K., *Determinación de la LCST por turbiodimetría y reología del copolímero tribloque termosensible poli(DAM-b-NIPAM-b-AM)*, Tesis de Licenciado, Colegio de ingeniería en materiales 2014, BUAP: Puebla. p. 48.
15. Rivera Vallejo, C., Pérez Berumen C., Polimerización radicálica controlada mediada por nitróxidos. Revista de Divulgación Cientifica CienciAcierta, 2013. No. 33
16. E. Kutnyanszky, A. Embrechts, *Is there a molecular signature of the LCST of single PNIPAM chains as measured by AFM force spectroscopy*. Chemical Physics Letters. 2012, 53:p. 126-130.
17. Grande, C.D., Zuluaga, F. *Polimerización por adición, fragmentación y transferencia reversible, RAFT: una revisión del mecanismo y el alcance de la técnica. Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2010. 11(6):p. 339-359.
18. Christopher Barner-Kowollik; Hand book of RAFT polymerization, Wiley-VCH; 2008.
19. J. P. A. Heuts, A. Muñoz-Bonilla, *Diseño macromolecular por transferencia de cadena*. Anales RSEQ, 2010. p.30-36.

20. Sáez, V., et al., *Liberación contralada de fármacos. Micropartículas*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2004. 5(2): p. 87-101.
21. F. W. Billlmeyer. *Ciencia de los polímeros. Editorial Reverté*. 1978, p. 40-41.
22. Siepmann, J., Siegel, R.A., *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. 2012:p 592
23. Goodman & gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Mc GrallHil. 2012.
24. Marek Drozdzik, Christian Gröer, Jette Penski., Protein Abundance of Clinically Relevant Multidrug Transporters along the Entire Length of the Human Intestine. Molecular Pharmaceutics, American Chemical Society, 2014. 11: p. 3547-3555.
25. Martín Villena, M.J., Morales, M.E., *Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos*. ARS Pharmaceutica, 2009. 50(1):p. 43-50.
26. Neira Carrillo, A. , Yáñez Muñoz, D., *Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: "Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina"* Avances en Ciencias Veterinarias, 2013. 28(2).
27. M. Murillo, S. Espuelas, S. Prior., Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. Revista Med Univ Navarra, 2001. 45(4).
28. Sáez, V., Hernández, E. *Liberación controlada de fármacos. Micropartículas.* Revista Iberoamericana de Polímeros, 2004. 5(2): p. 87-111.
29. Suñé Negre J.M., Nuevas aportaciones gálenicas a las formas de administración, Formación continuada para farmacéuticos de hospital, p. 28-64
30. E. Brown Michael., K. Gallagher Patrick. "handbook of thermal analysis and calorimetry", Elsevier vol. 5.
31. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman. "Principios de análisis instrumental", 5ª edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, 2001.
32. Wiley John, "characterization analysis of polymers", Editorial STAFF, 2008.