

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS, FISICAS Y MATEMATICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



TESIS

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES pH-SENSIBLES DE POLI(HEMA-PEG_xMEM-AI) PARA SU APLICACIÓN COMO SISTEMA DE TRANSPORTE DE ÁCIDO URSÓLICO A TRAVÉS DE LA VÍA ORAL

PRESENTADO POR:

Br. CARLOS DANIEL GUTIERREZ USCAMAYTA

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO

ASESORES:

Mgt. Rosana Leonor Aranzabal Carrasco

Dr. Michael Azael Ludeña Huaman

FINANCIADO POR: CONCYTEC-PROCIENCIA,
CONTRATO N° PE501085628-2023.

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: **"PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES pH-SENSIBLES DE POLI(HEMA-PEGxMEM-AI) PARA SU APLICACIÓN COMO SISTEMA DE TRANSPORTE DE ÁCIDO URSÓLICO A TRAVÉS DE LA VÍA ORAL"** presentado por: **Br. Carlos Daniel Gutierrez Uscamayta** con DNI Nro.: **70468542** para optar el título profesional/grado académico de **QUIMICO** Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de **.....6.....%**.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, ~~20~~ de NOVIEMBRE de 2024



Firma

Post firma: Rosana Leonor Aranzabal Carrasco

Nro. de DNI: 23878097

ORCID del Asesor: 0000-0002-6694-4616

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: **oid: 27259:407718802**

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS REPOSITORIO INSTITUCIONAL.pdf

AUTOR

daniel uscamayta

RECUENTO DE PALABRAS

25954 Words

RECUENTO DE CARACTERES

147927 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

99 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.5MB

FECHA DE ENTREGA

Nov 20, 2024 8:58 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Nov 20, 2024 9:00 PM GMT-5

● 6% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 5% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Introducción	XI
CAPÍTULO I	1
1. Planteamiento del problema.....	1
1.1 Justificación de la investigación	1
1.2 Planteamiento y formulación del problema de investigación	1
1.2.1 Formulación del problema General	2
1.2.2 Formulación de problemas específicos.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO II.....	4
2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	4
2.1 Antecedentes	4
2.1.1 Antecedentes Internacionales.....	4
2.1.2 Antecedentes Nacionales	6
2.2 Bases teóricas.....	6
2.2.1 Ácido Ursólico	6
2.2.2 Hidrogeles	8
2.2.3 Polímeros	8
2.2.3.1 Hidroxietilmetacrilato (HEMA).....	9
2.2.3.2 Polietilenglicol metiletermetacrilato (PEGxMEM)	9
2.2.3.3 Ácido itacónico	9
2.2.4 Tipos de hidrogeles	10
2.2.5 Síntesis de hidrogeles.....	11
2.2.5.1 Hidrogeles entrecruzados físicamente	11
2.2.5.2 Hidrogeles entrecruzados químicamente	12
2.2.6 Propiedades de los hidrogeles	13

2.2.6.1 Mecánicas	13
2.2.6.2 Biocompatibilidad y biodegradabilidad	13
2.2.6.3 Contenido de agua en equilibrio	14
2.2.7 Hidrogeles inteligentes.....	15
2.2.7.1 Hidrogeles sensibles a pH.....	15
2.2.8 Aplicaciones de los hidrogeles.....	17
2.2.8.1 Capacidad de albergar fármacos	18
2.2.8.2 Mecanismo de liberación desde hidrogeles	19
2.2.9 Modelos matemáticos de cinética de liberación	21
2.2.9.1 Orden cero.....	21
2.2.9.2 Primer orden.....	21
2.2.9.3 Hixson-Crowell.....	22
2.2.9.4 Higuchi.....	22
2.2.9.5 Korsmeyer-Peppas	22
2.2.10 Caracterización de hidrogeles	23
2.2.10.1 Espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR).....	23
2.2.10.2 Espectroscopia RAMAN	23
2.2.10.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	24
2.2.10.4 Análisis termogravimétrico (TGA).....	25
2.2.10.5 Difracción de rayos X (DRX).....	26
CAPÍTULO III.....	28
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	28
3.1 Formulación de hipótesis	28
3.2 Diseño metodológico	28
3.2.1 Tipo de investigación.....	28
3.2.2 Diseño de investigación	28
3.2.3 Operacionalización de variables	29
3.2.4 Reactivos.....	30
3.2.5 Equipos	30
CAPITULO IV.....	31
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	31
4.1 Obtención de ácido ursólico.....	31

4.2 Síntesis del hidrogel.....	32
4.2.1 Síntesis de hidrogeles de HG _x	32
4.2.2 Síntesis de hidrogeles cargados <i>in situ</i> con ácido ursólico HG _x -AU	33
4.3 CARACTERIZACIÓN INSTRUMENTAL.....	34
4.3.1 Análisis HPLC	34
4.3.2 Caracterización por FTIR-ATR	34
4.3.3 Microscopía RAMAN.....	34
4.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA).....	34
4.3.5 Análisis de difracción de rayos X (DRX).....	35
4.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	35
4.4 Caracterización fisicoquímica.....	35
4.4.1 Porcentaje de rendimiento.....	35
4.4.2 Comportamiento de hinchamiento	35
4.4.3 Respuesta al pH.....	36
4.5 Eficiencia de carga y encapsulación	36
4.5.1 Carga de ácido ursólico mediante absorción	36
4.5.2 Cargado <i>in situ</i> de ácido ursólico.....	37
4.6 Liberación controlada <i>in vitro</i>	37
CAPITULO V	39
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
5.1 Obtención de ácido ursólico.....	39
5.2 Determinación de pureza de ácido ursólico por HPLC	40
5.3 Caracterización FTIR del ácido ursólico	40
5.4 Síntesis de hidrogeles de poli(HEMA-PEG _x MEM-AI) (HG _x).....	41
5.5 Porcentaje de rendimiento de la reacción	45
5.6 Caracterización instrumental	46
5.6.1 Caracterización de los hidrogeles por FTIR-ATR.....	46
5.6.2 Caracterización de los hidrogeles por espectroscopía RAMAN.....	48
5.6.3 Análisis termogravimétrico (TGA).....	50
5.6.4 Análisis de difracción de rayos X (DRX).....	53
5.7 Caracterización fisicoquímica de los hidrogeles.....	54
5.7.1 Comportamiento de hinchamiento	54

5.7.2 Estudio de sensibilidad al pH.....	57
5.7.3 Morfología de los hidrogeles por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	59
5.7.3.1 Determinación del tamaño de poro del hidrogel.....	61
5.8 Eficiencia de carga y encapsulación	64
5.8.1 Curva de calibración estándar de ácido ursólico.....	64
5.8.2 Determinación de la concentración de AU en HG _x , EC y EE	64
5.9 Ensayo <i>in vitro</i> de liberación de ácido ursólico	66
5.9.1 Liberación <i>in vitro</i> del hidrogel HG ₅	66
5.9.2 Liberación <i>in vitro</i> del hidrogel HG ₉	70
6. CONCLUSIONES	73
7. RECOMENDACIONES	74
8. REFERENCIAS.....	75
9 APENDICE Y ANEXO	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cantidad de reactantes utilizados en la síntesis de hidrogeles.....	33
Tabla 2: Cantidad de reactantes utilizados en la síntesis de hidrogeles.....	33
Tabla 3: Porcentaje de rendimiento de la reacción	45
Tabla 4: Eficiencia de carga y encapsulación de los hidrogeles HG _x cargados por absorción.	65
Tabla 5: Eficiencia de carga y encapsulación de los hidrogeles HG _x cargados in situ.	65
Tabla 6: Parámetros calculados ajustando datos de liberación utilizando varios modelos matemáticos.	68
Tabla 7: Parámetros calculados ajustando datos de liberación utilizando varios modelos matemáticos.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química del ácido ursólico.....	7
Figura 2: Estructuras de los monómeros (a) HEMA, (b) PEGxMEM y (c) Ácido itacónico. 10	
Figura 3: Estímulos externos que generan respuesta al hidrogel.....	15
Figura 4: Grado de hinchamiento a pH básico, (a) a pH ácidos los grupos carboxílicos se encuentran protonados, (b) a pH alcalinos los grupos carboxílicos desprotonan adquiriendo cargas negativas lo cual induce al hinchamiento del hidrogel.	16
Figura 5: Grado de hinchamiento a pH ácido, (a) los grupos amino no se ionizan en un ambiente alcalino, (b) en un ambiente ácido por debajo de su pKa, los grupos amino ionizan, provocando el hinchamiento del hidrogel por repulsión de cargas.....	17
Figura 6: Perfil de liberación tradicional y liberación controlada.	18
Figura 7: Esquema de liberación controlada por difusión, hinchamiento y químicamente a partir de hidrogel previamente cargado.	20
Figura 8: Representación esquemática de un sistema ATR-FTIR.	23
Figura 9: Principio de la dispersión Raman (A) dispersión RAMAN y Rayleigh; (B) niveles de energía de dispersión Raman, Rayleigh y absorción infrarroja.	24
Figura 10: Representación esquemática de un microscopio electrónico de barrido.....	25
Figura 11: Diagrama de una termobalanza.....	26
Figura 12: Ilustración de difracción de rayos X (DRX).	27
Figura 13: Proceso de obtención de ácido ursólico.	31

Figura 14: Cromatograma del cristal de AU	40
Figura 15: Espectro FTIR del ácido ursólico.....	41
Figura 16: Hidrogeles de p(HEMA-PEG _x MEM-AI), (a) con APS, (b) con AIBN, (c) por fotopolimerización sin AU y (d) por fotopolimerización con AU.....	43
Figura 17: Reacción general de síntesis del hidrogel HG _x	44
Figura 18: Espectro FTIR de los monómeros AI, HEMA, PEG ₅ MEM y del hidrogel HG ₅ ..	47
Figura 19: Espectro FTIR de los hidrogeles sintetizados.....	48
Figura 20: Espectro RAMAN del monómero PEG ₅ MEM y el hidrogel HG ₅	49
Figura 21: Espectro RAMAN y FTIR del hidrogel HG ₅	50
Figura 22: Termogramas TGA y DTG de AU.....	51
Figura 23: Termogramas TGA y DTG de hidrogel HG ₅	52
Figura 24: Termogramas TGA y DTG del hidrogel HG ₉	53
Figura 25: Espectros DRX HG ₅ , HG ₉ y AU (reportado por Qiu <i>et al.</i> (2019)).....	54
Figura 26: Comportamiento de hinchamiento de HG ₉ en diferentes medios.....	56
Figura 27: Comportamiento de hinchamiento de HG ₅ en diferentes medios.....	56
Figura 28: Comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles HG ₅ y HG ₉	57
Figura 29: Grado de hinchamiento en pH 2,2 y 7,4 durante tres ciclos sucesivos.....	58
Figura 30: Estructura morfológica del hidrogel HG ₅ (a), (b) en medio ácido pH 2,2 y HG ₅ (c), (d) en medio básico pH 7,4.....	59
Figura 31: Estructura morfológica del hidrogel HG ₉ (a), (b) en medio ácido pH 2,2 y (c), (d) hidrogeles en medio básico pH 7,4.....	60
Figura 32: Micrografía de la sección transversal e histograma HG ₅ (a), (b); micrografía de la superficie e histograma de HG ₅ (c), (d) en pH 7,4.....	61
Figura 33: Micrografía de la sección transversal e histograma HG ₉ (a), (b); micrografía de la superficie e histograma de HG ₉ (c), (d) en pH 7,4.....	62
Figura 34: Hidrogeles cargados con ácido ursólico (a) HG ₅ pH 2,2; (b) HG ₅ pH 7,4; (c) HG ₉ pH 2,2; (d) HG ₉ pH 7,4.....	63
Figura 35: Modelo de curva de calibración estándar de ácido ursólico.....	64
Figura 36: Liberación <i>in vitro</i> de ácido ursólico del hidrogel HG ₅	66
Figura 37: Regresiones lineales de modelos matemáticos cinéticos.....	68
Figura 38: Liberación <i>in vitro</i> de ácido ursólico del hidrogel HG ₉	70
Figura 39: Regresiones lineales de modelos matemáticos cinéticos.....	71

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mis asesores Dr. Michael A. Ludeña Huaman y Mgt. Rosana L. Aranzabal Carrasco, por las acertadas recomendaciones, el constante apoyo y la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Elvira Pujalte y Dr. Alberto Gallardo Ruiz por haberme aceptado en su grupo de investigación FUPOL para la realización de una estancia de investigación en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros ICTP Madrid-España, por un periodo de 3 meses.

A Felipe, Raúl y Pedro, más que compañeros de trabajo fueron amigos que hicieron más agradable mi estancia en el instituto, me enseñaron nuevas formas de ver la química y disfrutarla tal y cómo es desde los procesos más simples hasta los más complejos.

Al Dr. Carlos Alberto Serrano Flores por sus acertadas sugerencias ya que tiene un amplio conocimiento de la química de los triterpenos y además por el apoyo en el análisis por HPLC, así mismo, agradecer a la Dra. Flor de Liz y Mgt. Renee Isabel quienes fueron parte importante en el desarrollo de esta tesis, su experiencia y apoyo constante fueron cruciales para poder alcanzar los objetivos planteados en este trabajo.

A la Mgt. Ana Maria Lechuga Chacon por su constante apoyo y motivación, a mis compañeras de trabajo, Fiorela, Karen, Andrea y Adriana, por las experiencias vividas dentro del laboratorio de química inorgánica.

A CONCYTEC-PROCIENCIA por el apoyo financiero en el presente trabajo de investigación con contrato N° PE501085628-2023.

Finalmente quiero terminar agradeciendo a mis padres, fueron un motor indispensable para la realización y culminación de esta tesis.

ABREVIATURAS

HEMA: 2-hidroxietilmetacrilato

PEGxMEM: Polietilenglicol metiletermetacrilato

AI: Acido itacónico

AU: Acido ursólico

MBA: N,N'- metilenbisacrilamida

HCPK: 1-hidroxiciclohexilfenilcetona

HG: Hidrogel

HG₅: Hidrogel de poli(HEMA-PEG₅MEM-AI)

HG₉: Hidrogel de poli(HEMA-PEG₉MEM-AI)

HGx-AU: Hidrogel cargado con ácido ursólico

HPLC: Cromatografía Líquida de alto Rendimiento

UV-VIS: Ultravioleta – Visible

FTIR-ATR: Espectroscopia Infrarroja Acoplada a Reflectancia Total Atenuada.

DRX: Difracción de rayos X

TGA: Análisis termogravimétrico

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

TWEEN 80: Polisorbato 80

SEM: Microscopia Electronica de Barrido

EE: Eficiencia de encapsulación

EC: Eficiencia de carga

MetOH: Metanol

EtOH: Etanol

MEHQ: Hidroquinina monometiléter

BHT: Butilhidroxitolueno

**“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE POLI(HEMA-
PEG_xMEM-AI) PARA SU APLICACIÓN COMO SISTEMA DE TRANSPORTE DE
ÁCIDO URSÓLICO A TRAVÉS DE LA VÍA ORAL”**

Resumen

En el presente trabajo se realizó la síntesis de hidrogeles sensibles a pH, a partir de la polimerización de radicales libres basados en los monómeros polietilenglicol metiletermetacrilato (PEG_xMEM), 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y ácido itacónico (AI). La polimerización se realizó en solución etanólica, se usó metilbisacrilamida (MBA) como agente reticulante, 1-hidroxiciclohexilfenilcetona (HCPK) como iniciador y activada por fotopolimerización a 365 nm. El hidrogel poli(HEMA-PEG_xMEM-AI) (HG_x) fue usado para evaluar su potencial como sistema de transporte de ácido ursólico, el mismo que fue extraído de la planta *Clinopodium revolutum* (flor de arena). La caracterización del hidrogel HG_x fue realizado por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR), espectroscopia RAMAN, difracción de rayos X (DRX), análisis termogravimétrico (TGA) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Se estudió el comportamiento de hinchamiento en soluciones tampón de pH 2 hasta pH 10, así como, en pH 2,2 (ambiente gástrico) y 7,4 (ambiente intestinal) de manera específica. Los resultados mostraron una exitosa polimerización con un rendimiento de 81,9 %. El grado de hinchamiento de los hidrogeles HG₅ y HG₉ en pH 2,2 fue de 0,45 y 0,93 (g agua /g hidrogel), mientras que en pH 7,4 fue de 1,97 y 2,64 (g agua /g hidrogel) respectivamente. El estudio morfológico de los hidrogeles por SEM permitió observar la variación del tamaño de los poros, el cual depende del pH al que se somete. Así mismo, el SEM permitió observar la correcta encapsulación del ácido ursólico dentro de la red polimérica. Los hidrogeles sintetizados presentaron una eficiencia de carga de 3,20 % (HG₅) y 2,69 % (HG₉), así como una eficiencia de encapsulación de 86,69 % (HG₅) y 85,86 % (HG₉). El estudio de liberación *in vitro* reveló una cinética de liberación que sigue el modelo de Korsmeyer-peppas ($R^2 = 0,75$). Por tanto, estos hidrogeles podrían ser candidatos prometedores para nuevos sistemas de transporte de compuestos bioactivos.

Palabras clave: liberación, administración, ácido itacónico, HEMA, fotopolimerización, ácido ursólico.

**“PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(HEMA-PEG_xMEM-AI)
HYDROGELS FOR APPLICATION AS URSOLIC ACID DELIVERY SYSTEM BY
THE ORAL VIA”**

Abstract

In this study, pH-sensitive hydrogels were synthesized through free radical polymerization using the monomers polyethylene glycol methylether methacrylate (PEG_xMEM), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), and itaconic acid (IA). The polymerization was carried out in an ethanolic solution, with methylenebisacrylamide (MBA) as the cross-linking agent and 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone (HCPK) as the initiator, activated by photopolymerization at 365 nm. The poly(HEMA-PEG_xMEM-AI) hydrogel was evaluated for its potential as a delivery system for ursolic acid, which was extracted from the plant *Clinopodium revolutum* (Flor de Arena). The HG_x hydrogel was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR), RAMAN spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), and scanning electron microscopy (SEM). The swelling behavior was studied in buffer solutions ranging from pH 2 to pH 10, with specific focus on pH 2.2 (gastric environment) and 7.4 (intestinal environment). Results showed successful polymerization with yield of 81.9 %. The absence of the C=C signal at 1630 cm⁻¹ in the FTIR and RAMAN spectra confirmed successful polymerization. The swelling degree of the HG₅ and HG₉ hydrogels at pH 2.2 was 0.45 and 0.93 (g water/g hydrogel), respectively. While at pH 7.4, was 1.97 and 2.64 (g water/g hydrogel), respectively. SEM analysis revealed variations in pore size depending on the pH conditions and confirmed the correct encapsulation of ursolic acid within the polymeric network. The synthesized hydrogels exhibited a loading efficiency of 3.20 % (HG₅) and 2.69 % (HG₉), and an encapsulation efficiency of 86.69 % (HG₅) and 85.86 % (HG₉). The *in vitro* release study indicated that the release kinetics followed the Korsmeyer-Peppas model ($R^2 = 0.75$). Therefore, these hydrogels could be promising candidates for new drug delivery systems.

Keywords: *release, delivery, HEMA, itaconic acid, photopolymerization, ursolic acid.*

Introducción

El ácido ursólico (AU) es un triterpeno pentacíclico que ha surgido como una molécula de interés farmacológico debido a sus diversas propiedades farmacológicas. Este compuesto se puede aislar de varias plantas como *Rosmarinus officinalis* (romero), *Malus domestica* (manzana), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis* (salvia) (Pironi *et al.*, 2018) y de *Clinopodium revolutum* (flor de arena) que es una planta endémica del Perú comúnmente conocida como flor de arena (Ludeña *et al.*, 2021). Estudios realizados han destacado que la biomolécula de ácido ursólico presenta propiedades farmacológicas muy importantes como antioxidante, antiinflamatorio (Habtemariam, 2019), antimicrobiano (Jyoti *et al.*, 2016), anticancerígeno (Iqbal *et al.*, 2018), etc. Sin embargo, debido a la escasa solubilidad del ácido ursólico en agua, esta molécula presenta una pobre biodisponibilidad lo que dificulta su aplicación clínica. Es así que, estudios de los últimos años se enfocan en desarrollar sistemas que transporten el ácido ursólico al sitio de absorción para de esa forma mejorar su biodisponibilidad (Jin *et al.*, 2016; T. Li *et al.*, 2017; Shao *et al.*, 2020). Entre estos sistemas de transporte los hidrogeles son una propuesta novedosa para solucionar el problema del ácido ursólico. Estos materiales poliméricos pueden ser diseñados para ser biocompatibles y exhibir respuesta frente a estímulos externos (Uman *et al.*, 2020). Los hidrogeles que responden a estímulos externos como el pH, luz, campo magnético, temperatura, etc., se conocen como hidrogeles inteligentes, estas propiedades los hace adecuados para explorar una gran variedad de aplicaciones y ser usados en diferentes áreas como la biomedicina desde la administración de fármacos hasta la ingeniería de tejidos (El-Husseiny *et al.*, 2022). En los últimos años los hidrogeles sensibles a pH han mostrado un gran potencial como sistemas de transporte de fármacos a través de la vía oral, debido a que responden al cambio de pH gastrointestinal; por tanto pueden llegar a liberar el fármaco de manera controlada en sitios específicos de tejidos u órganos sin necesidad de tener que preocuparse de los efectos secundarios (Rizwan *et al.*, 2017). Además, los hidrogeles son materiales biocompatibles, es decir, no provocan ningún efecto indeseado cuando se encuentra en contacto con alguna parte del cuerpo humano. Los hidrogeles basados en poli HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato) son una opción particularmente interesante, por esta razón, se incorpora el monómero ácido itacónico (AI) para proporcionar grupos ionizables y de esta manera el hidrogel pueda responder a cambios de pH. Además, ha sido reportado que la incorporación del monómero PEGxMEM (polietilenglicol metiletermetacrilato) le confiere al hidrogel una mejor biocompatibilidad para poder ser usado como sistema de transporte de sustancias bioactivas a través de la vía oral oral (Hoang Thi

et al., 2020; Gola *et al.*, 2022). Por lo tanto, en este trabajo de investigación se realizó la síntesis de hidrogeles de poli(HEMA-PEG_xMEM-AI) (HG_x) por polimerización radical convencional, iniciado por fotoionización (4 watts, 365 nm). Se realizó una caracterización instrumental de los hidrogeles por espectroscopía infrarroja FTIR-ATR, por espectroscopía RAMAN y microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, también se evaluó el grado de hinchamiento, así como su respuesta frente al cambio de pH simulando las condiciones fisiológicas del cuerpo humano, para lo cual se usaron soluciones tampón y se trabajó a temperatura de 37 °C (temperatura corporal). Finalmente se realizó un estudio *in vitro* de la liberación del ácido ursólico.

CAPÍTULO I

1. Planteamiento del problema

1.1 Justificación de la investigación

El diseño, estudio y síntesis de nuevos materiales inteligentes que presenten propiedades de respuesta frente a estímulos externos y sean capaces de transportar dentro de su red polimérica el principio activo o fármaco, presenta grandes ventajas y beneficios muy favorables en el ámbito de la biomedicina. Es por ello que en los últimos años se ha mostrado gran interés dentro de la comunidad científica y la industria farmacéutica en la síntesis de hidrogeles sensibles al pH que permitan la administración del fármaco a través de la vía oral. El sintetizar hidrogeles de poli(HEMA-PEG_xMEM-AI) (HG_x) sensibles al pH, nos dará la posibilidad de cargar moléculas hidrofóbicas de baja permeabilidad como el ácido ursólico (AU) dentro de la red polimérica para poder ser administrado a través de la vía oral y de esta forma este sistema sea capaz de proteger el principio activo del pH ácido del estómago (pH 2,2) y poder transportarlo al intestino delgado (pH 7,4) donde podrá ser liberado, de esta forma se lograría conseguir una mejor biodisponibilidad y se podría aprovechar el potencial farmacológico del ácido ursólico. Es importante también mencionar que el ácido ursólico es un metabolito secundario que se puede aislar del *Clinopodium revolutum* (flor de arena) una planta endémica del Perú y comercializada en varias herboristerías. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema que sea capaz de proteger, transportar y mejorar la biodisponibilidad del ácido ursólico y aprovechar todo su potencial como principio activo es un trabajo de mucho interés.

1.2 Planteamiento y formulación del problema de investigación

El ácido ursólico presenta pobre biodisponibilidad por ser una molécula con escasa solubilidad en el agua y baja permeabilidad. Esto provoca que el ácido ursólico tenga una deficiente absorción intestinal y sea eliminado rápidamente mediante el metabolismo hepático de la pared intestinal, lo que dificulta su aplicación clínica, por lo que, estudios recientes vienen centrándose en mejorar la biodisponibilidad del ácido ursólico. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema que pueda transportar el ácido ursólico a través de la vía oral y liberarlo en el sitio de absorción tiene varias ventajas como proteger al ácido ursólico del pH ácido del estómago incrementando su potencial farmacológico ya que habrá mayor cantidad del compuesto disponible en el sitio de absorción (intestino delgado pH 7,4). El uso de hidrogeles como

sistema de transporte de principios activos a sitios específicos de absorción es explorado en los últimos años. Sin embargo, no hay estudios sobre la síntesis de hidrogeles que sean capaces de transportar el ácido ursólico al intestino delgado en donde es absorbido, pese a ser una molécula que posee efectos farmacológicos como el de antitumoral, antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, etc. Por tal motivo, este trabajo de investigación busca sintetizar y caracterizar hidrogeles de poli(HEMA-PEGxMEM-AI) que sean capaces de mostrar respuesta frente a estímulos de pH, para aplicarlos como sistema de transporte del ácido ursólico a través de la vía oral de tal modo aprovechar todo el potencial del ácido ursólico.

1.2.1 Formulación del problema General

¿Es posible preparar y caracterizar hidrogeles pH-sensibles basados en poli(HEMA-PEGxMEM-AI) para aplicarlos como sistema de transportes del ácido ursólico?

1.2.2 Formulación de problemas específicos

- ¿Es posible extraer y purificar ácido ursólico por cristalización a partir de la especie *Clinopodium revolutum* (flor de arena) y caracterizarlo por FTIR y HPLC?
- ¿Se puede sintetizar hidrogeles de poli(HEMA-PEGxMEM-AI) a través de reacciones de por polimerización radicalaria?
- ¿Cuál es el comportamiento de los hidrogeles frente al cambio de pH?
- ¿Será posible caracterizar los hidrogeles mediante técnicas espectroscópicas complementarias de FTIR y RAMAN?
- ¿Se podrá evaluar la morfología de los hidrogeles sintetizados mediante microscopia electrónica de barrido (SEM)?
- ¿Se podrá evaluar la carga y liberación del ácido ursólico en condiciones que simulen el sistema fisiológico, temperatura de 37 °C, pH estomacal 2,2 y pH intestinal 7,4?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Preparar y caracterizar hidrogeles pH-sensibles basados en poli(HEMA-PEGxMEM-AI) para su aplicación como sistema de transporte del ácido ursólico vía oral.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Extraer y purificar ácido ursólico por cristalización a partir de la especie *Clinopodium revolutum* (flor de arena) y caracterizarlo por FTIR y HPLC.
- Sintetizar hidrogeles de poli(HEMA-PEGxMEM-AI) a través de reacciones de polimerización radicalaria.
- Evaluar la respuesta de los hidrogeles sintetizados frente al cambio de pH.
- Caracterizar los hidrogeles de poli(HEMA-PEGxMEM-AI) por espectroscopía infrarroja FTIR y RAMAN.
- Evaluar la morfología de los hidrogeles de poli(HEMA-PEGxMEM-AI) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar la carga y liberación de ácido ursólico en condiciones que simulen el sistema fisiológico, temperatura 37 °C, pH estomacal 2,2 y pH intestinal 7,4.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 Antecedentes

Los primeros trabajos sobre hidrogeles surgen a mediados de la década de 1930, con el estudio sobre la cinética de polímeros reticulados, no obstante, en la década de 1940 gracias a la investigación del premio Nobel Paul Flory se dio una comprensión más amplia y detallada de la estructura reticulada de los hidrogeles, sus características de hinchazón y el comportamiento de deformación en diferentes fluidos (Peppás & Hoffman, 2020), sin embargo, desde 1984 en adelante se observa una tendencia creciente en el número de artículos publicados referidos a trabajos de investigación con hidrogeles (Mahinroosta *et al.*, 2018).

Es en tanto que, siguiendo esta vanguardia de trabajos publicados referente a hidrogeles, surge la iniciativa de formular hidrogeles inteligentes, capaces de reaccionar y dar respuesta frente al cambio de su entorno que experimenten, por tanto, las investigaciones en las últimas décadas se ha centrado en sistemas de administración controlada de fármacos, dichos sistemas pueden controlar cómo los fármacos pueden ser liberados y estar disponibles para las células y los tejidos a lo largo del tiempo, mejorando su eficacia y reduciendo su toxicidad (J. Li & Mooney, 2016).

2.1.1 Antecedentes Internacionales

El trabajo desarrollado por Li *et al.* (2017) titulado “Profármacos anticancerígenos de nanopartículas de sílice mesoporosas sensibles al pH para la liberación sostenida del ácido ursólico y la eficacia anticancerígena mejorada para el cáncer de carcinoma hepatocelular” muestra la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas funcionalizadas con ácido ursólico (UA@MSN-UA) sensibles al pH, donde dichas nanopartículas mejoran la biodisponibilidad de ácido ursólico y exhibe una mejor eficacia anticancerígena, exhibiendo un perfil de liberación sostenida las primeras 20 horas, además, el experimento mostró que en comparación del ácido ursólico libre administrado directamente, las MNS (nanopartículas de sílice mesoporosa) se infiltraron rápidamente en las células tumorales.

Antônio *et al.* (2017) en su estudio titulado “Nanopartículas de poli(ácido láctico) cargadas con ácido ursólico: caracterización y evaluación *in vitro* de la actividad eliminadora de radicales y

citotoxicidad” prepararon nanopartículas cargadas con ácido ursólico obteniendo una eficiencia de encapsulación del 96 %, y el estudio *in vitro* demostró una liberación de segundo orden, en donde, luego de 120 horas el 60 % de ácido ursólico se liberó por difusión. El ensayo de citotoxicidad demostró que las nanopartículas fueron capaces de reducir la viabilidad celular, manteniendo la actividad antioxidante y antitumoral.

Wang *et al.* (2017) trabajaron en la síntesis de CS-AU-L (liposoma de ácido ursólico recubierto con quitosano), esta nanopartícula presentó un diámetro de 130 nm, una eficiencia de encapsulación del ácido ursólico del 94,3 % y una liberación inicial rápida seguida de una fase de liberación sostenida lenta, además, el quitosano carga positivamente a los liposomas, los cuales podrían combinarse con las cargas negativas de los tejidos tumorales y de esta forma liberar el ácido ursólico a un pH tumoral, demostrando de esta manera su gran promesa como terapia tumoral.

Poudel *et al.* (2020) sintetizaron nanofitoliposomas cargados con ácido ursólico, diseñados para mejorar su biodisponibilidad, biodistribución y la liberación sostenida del fármaco a través del tiempo, estos nanofitoliposomas estaban envueltos en una capa de poli-L-lisina (PLL) y ácido hialurónico, lo que proporciona una liberación controlada y dirigida.

Miatmoko *et al.* (2021), en su estudio titulado “Caracterización y distribución de niosomas que contienen ácido ursólico recubiertos con una capa de quitosano” evalúan el efecto de las diferentes proporciones de Span 60-colesterol-UA para mejorar la biodistribución oral del ácido ursólico, en donde, se observó una eficiencia de encapsulación relativamente baja con un valor de 11,8 %, no obstante, la liberación del ácido ursólico de la matriz polimérica fue de 15,29 % en pH 6,8 y 16,27 % en pH 7,4, por lo tanto, este estudio concluyó que la adición de quitosano mejora la estabilidad y la liberación del fármaco.

Antonio *et al.* (2021), en su estudio titulado “Las nanopartículas de poli(ácido láctico) modificadas con quitosano aumentaron la biodisponibilidad oral del ácido ursólico” desarrollaron nanopartículas de poli ácido láctico modificadas con quitosano para la administración de ácido ursólico destinado al tratamiento del cáncer, en donde, se logró obtener nanopartículas con una eficiencia de encapsulación del 90 %, además, se demostró que el perfil de liberación del ácido ursólico luego de las 144 horas fue bifásico, sostenido y dependiente de la difusión, alcanzando un valor de liberación del 53 %, por otro lado, se comprobó que después de la administración oral en ratas, las nanopartículas mejoraron significativamente todos los

parámetros farmacocinéticos del ácido ursólico mostrando una aplicación potencial para la terapia del cáncer.

2.1.2 Antecedentes Nacionales

A pesar de una revisión exhaustiva en base a datos bibliográficas como PubMed, Scopus, Web of Science y Google Scholar bajo las palabras clave como “*hydrogels for drug delivery*”, y “*hydrogels for ursolic acid delivery*”, no se han identificado trabajos relevantes centrados en aplicación de hidrogeles para la liberación de ácido ursólico en el contexto nacional, sin embargo, los pocos trabajos relacionados abordan la síntesis y caracterización de hidrogeles.

Huaman *et al.*, (2023) desarrollaron y analizaron hidrogeles de poli(2-hidroxietil metacrilato-co-ácido itacónico) y poli(2-hidroxietil metacrilato-co-itaconato de sodio). Estos hidrogeles fueron analizados por sus propiedades de hinchamiento y capacidad de respuesta frente al cambio de pH. Los resultados sugieren que el hidrogel poli(2-hidroxietil metacrilato-co-ácido itacónico) tiene un potencial significativo para ser utilizado en sistemas de liberación de fármacos que requieran una liberación controlada. A pH 2,2 el hidrogel no se hincha manteniéndose estable, mientras que a pH 7,4 el hidrogel muestra una capacidad de hinchamiento significativa, indicando una respuesta efectiva frente a cambios de pH.

Aunque este estudio no aborda directamente la liberación de fármacos, las propiedades observadas sugieren que estos podrían ser útiles en aplicación para liberación controlada de medicamentos. La falta de investigaciones nacionales sobre la liberación de ácido ursólico subraya la necesidad de explorar y optimizar hidrogeles con capacidad de respuesta al pH para mejorar su eficacia terapéutica de moléculas hidrofóbicas.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Ácido Ursólico

Las plantas son la base, fuente e inspiración para el diseño de agentes terapéuticos gracias a las propiedades farmacológicas que presentan, los cuales son efectivos para el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, trastornos cardiovasculares, efectos antitumorales, antiinflamatorios, hepatoprotectores, antioxidantes, etc. Los triterpenoides representan una gran familia de compuestos y comprenden más de 20 000 terpenoides identificados, incluido el ácido ursólico (Kashyap *et al.*, 2016). El ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-ico)

es un triterpeno pentacíclico con anillos A,B,C,D y E (**Figura 1**) que está presente frecuentemente en la dieta humana, esta molécula se distribuye ampliamente en las plantas, vegetales y frutos formando agliconas con saponinas ácidas libres (Bacanli *et al.*, 2018), por lo que se puede aislar de varias plantas como *Rosmarinus officinalis* (romero), *Malus domestica* (manzana), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis* (salvia) (Pironi *et al.*, 2018), *Clinopodium revolutum* (flor de arena) (Ludeña *et al.*, 2021). La biomolécula de ácido ursólico presenta propiedades farmacológicas muy importantes como antioxidante, antiinflamatorio (Habtemariam, 2019), antimicrobiano (Jyoti *et al.*, 2016), anticancerígeno (Iqbal *et al.*, 2018), etc. Sin embargo, la escasa solubilidad del ácido ursólico en agua (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2023), le da una baja biodisponibilidad lo que dificulta su aplicación clínica, por lo que estudios recientes vienen centrándose en mejorar la biodisponibilidad del ácido ursólico. Jin *et al.* (2016) describe la preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con ácido ursólico donde se muestra que el sistema propuesto podría ser un gran candidato para el tratamiento antiangiogénico; las síntesis de nanopartículas de quitosano encapsuladas con AU se realizaron por la reacción de reticulación covalente entre el grupo carboxilo de AU y el grupo amino del quitosano. El trabajo desarrollado por Li *et al.* (2017) muestra la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) funcionalizadas con ácido ursólico (AU) sensibles al pH. Estas nanopartículas mejoran la biodisponibilidad de ácido ursólico y exhiben una mejor eficacia anticancerígena. Estos nanosistemas son candidatos potenciales para el tratamiento antiangiogénico, la proliferación, invasión y metástasis en células de carcinoma de hepatoma humano tanto *in vitro* como *in vivo* (Shanmugam *et al.*, 2013).

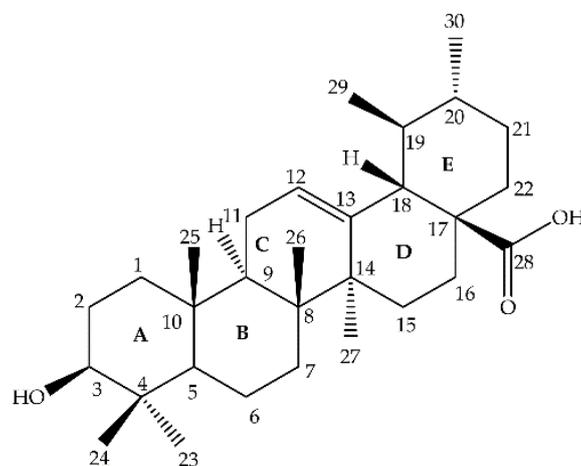


Figura 1: Estructura química del ácido ursólico (Mlala *et al.*, 2019).

2.2.2 Hidrogeles

Los hidrogeles son polímeros entrecruzados con estructuras macromoleculares tridimensionales 3D formados por interacciones físicas, químicas o de ambos tipos, los cuales se obtienen a partir de polímeros sintéticos o naturales (Bercea, 2022). Dependiendo de su naturaleza, densidad de entrecruzamiento e hidrofilia estas redes tridimensionales pueden absorber una gran cantidad de agua sin llegar a disolverse gracias al entrecruzamiento físico o químico de las cadenas poliméricas individuales, sin embargo, la hidrofilia de la red se debe a la presencia de grupos hidrofílicos como $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH-$, y $-SO_3H$. El porcentaje de hinchamiento del hidrogel se debe a un estado de equilibrio presente entre las fuerzas cohesivas y dispersivas que actúan dentro de la red polimérica hidratada, esta red se encuentra interconectada a través de enlaces covalentes (entrecruzamiento químico) o interacciones físicas (entrecruzamiento físico) (Bahram *et al.*, 2016).

Con el pasar de los años los hidrogeles han despertado un gran interés debido a sus propiedades, estructuras específicas y compatibilidad en diferentes condiciones de uso, la flexibilidad es una característica distinguible con respecto a otros biomateriales, por lo que en la última década se ha centrado su estudio en aplicaciones que incluyen la administración de fármacos, la eliminación de tintes y metales pesados, ingeniería de tejidos, etc., (Mahmood *et al.*, 2022).

2.2.3 Polímeros

Los polímeros son cadenas de moléculas largas (macromoléculas), las cuales resultan de la unión química de miles de moléculas pequeñas a las que se les denomina monómeros, el número de monómeros dentro de la estructura del polímero puede variar mucho. Según el monómero presente en la síntesis del polímero, podemos tener una amplia y variada terminología, por ejemplo, si son formados por la combinación de un mismo monómero se les denomina homopolímeros, pero si son el resultado de la polimerización de dos o más monómeros distintos se les denomina copolímeros (Gu *et al.*, 2020).

Los siguientes monómeros son usados en la síntesis de polímeros biocompatibles, los cuales presentan un gran interés en aplicaciones biomédicas, estos monómeros permiten que el hidrogel mantenga su funcionalidad y eficacia en el entorno biológico sin desencadenar reacciones adversas u otros efectos secundarios no deseados. A continuación, se describen estos monómeros:

2.2.3.1 Hidroxietilmetacrilato (HEMA)

El hidrogel poli-2-Hidroxietilmetacrilato (PHEMA) se define como un polímero formado por una red tridimensional basada en HEMA (**Figura 2 a.**), los hidrogeles basados en HEMA son económicos y presentan varias propiedades destacadas: excelente biocompatibilidad, citocompatibilidad, estabilidad a diferentes temperaturas, resistencia a la hidrólisis ácida y básica y propiedades mecánicas ajustables. Estas características hacen que el PHEMA sea particularmente atractivo en el campo de aplicaciones biomédicas, tales como la curación de heridas, regeneración de tejidos óseos, administración de fármacos, implantes, prótesis, terapia contra el cáncer, entre otros (Saptaji *et al.*, 2021).

2.2.3.2 Polietilenglicol metiletermetacrilato (PEGxMEM)

El polietilenglicol (PEG) es uno de los materiales más utilizados para aplicaciones biomédicas, estos monómeros a base de PEG son estructuras particularmente atractivas por presentar un grado bastante alto de biocompatibilidad, flexibilidad y no toxicidad, por lo que son bloques de construcción versátil para la preparación de hidrogeles inteligentes con propiedades ajustables (Dobić *et al.*, 2012). El PEG (**Figura 2 b.**) presenta una estructura lineal o ramificada con grupos hidroxilo disimétrico o asimétrico como grupos de cola, el PEG es soluble en agua, etanol, acetonitrilo, benceno y diclorometano, mientras que es insoluble en hexano y éter dietílico, estas propiedades lo convierten en el monómero sintético más usado en el campo de la biotecnología y la biomedicina, especialmente en la administración de fármacos por ser un monómero aprobado por la FDA (Li *et al.*, 2022).

2.2.3.3 Ácido itacónico

El ácido itacónico es monómero de base biológica versátil con investigación activa, se produce a escala industrial a través de fermentación de azúcares, los géneros de microorganismos más importantes en la producción de ácido itacónico son: *Ustilago*, *Pseudozyma* y especialmente *Aspergillus*, las aplicaciones de este monómero están muy extendidas y van desde la inhibición de la corrosión a los materiales dentales, elastómeros hasta la entrega de medicamentos (Robert & Friebel, 2016; De Carvalho *et al.*, 2018). El ácido itacónico (**Figura 2 c.**) presenta en su estructura una funcionalidad α,β -insaturada, esto le permite la polimerización o reticulación medida por radicales, por lo que se han preparado diversos polímeros y copolímeros derivados de ácido itacónico con propiedades ajustables, estos derivados presentan una variedad de nuevas aplicaciones, tal es el caso de la síntesis de híbridos a base de ácido itacónico y

andamios de fluoro anilina, piridina, indol y quinolina, estos híbridos presentaron propiedades farmacológicas favorables, por lo que podrían servir como compuestos de partida para una mayor optimización y desarrollo de agentes anticancerígenos más potentes (Perković *et al.*, 2022).

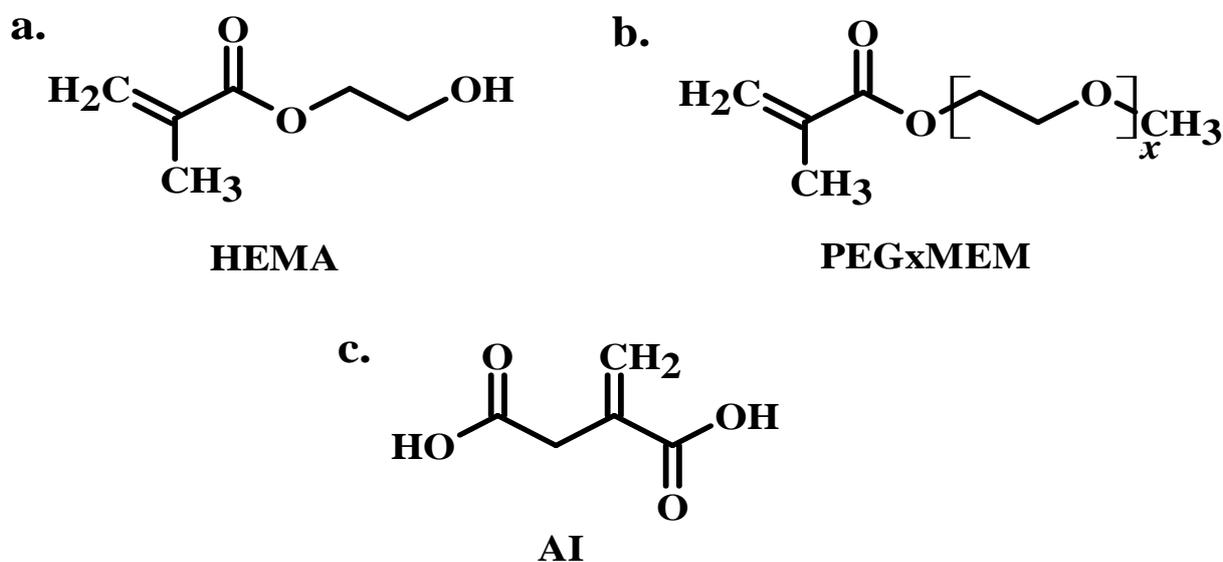


Figura 2: Estructuras de los monómeros (a) HEMA, (b) PEG_xMEM y (c) Ácido itacónico.

2.2.4 Tipos de hidrogeles

Los hidrogeles se clasifican en diferentes formas ya sea según la fuente original (polímero natural o sintético), por el método de reticulación (química y física), por su estructura física (amorfo, cristalino, semicristalino), por su carga iónica (aniónica, catiónica, anfótera y neutro), por su tamaño (macro geles, microgeles, nanogeles) y por su biodegradabilidad (degradables y no degradables) (Huang *et al.*, 2019). Sin embargo, otros autores tienden a clasificar a los hidrogeles de la siguiente forma: según la ruta de síntesis pueden ser homopolímeros, copolímeros y multi polímeros, en donde los homopolímeros se preparan a partir de un solo tipo de monómero, los copolímeros comprenden dos tipos de polímeros y los multi polímeros se preparan a partir de tres o más monómeros (López Carrillo *et al.*, 2022); desde un punto de vista de su tamaño podemos tener hidrogeles macroscópicos (con tamaños que van de milímetros a centímetros), microgeles (en su mayoría partículas con diámetro comprendido entre 50 nm a 10 μm) y nanogeles (tamaños menores a 1 μm) (Escalona Rayo & Quintanar Guerrero, 2014) y en término de cargas iónicas tenemos hidrogeles neutros (sin carga), hidrogeles aniónicos (carga negativa), hidrogeles catiónicos

(carga positiva) e hidrogeles anfólicos (con carga positiva como negativa) (Peppas & Hoffman, 2020).

2.2.5 Síntesis de hidrogeles

Los hidrogeles se sintetizan a través de un proceso llamado gelificación, el cual se refiere a un proceso de unión de cadenas macromoleculares hasta formar una red reticulada tridimensional, estas cadenas poliméricas determinarán las propiedades del hidrogel, la gelificación puede tener lugar por entrecruzamiento físico (gelificación física) o por entrecruzamiento químico (gelificación química) (Gulrez *et al.*, 2011).

2.2.5.1 Hidrogeles entrecruzados físicamente

Los hidrogeles físicamente reticulados o reversibles presentan un gran interés debido a la relativa facilidad de síntesis y la no utilización de agentes de reticulación, sin embargo el principal inconveniente de estos hidrogeles es su inestabilidad relativa y su posible desintegración rápida, en este tipo de hidrogeles el entrecruzamiento de las cadenas se lleva a cabo mediante interacciones no covalentes, los diversos métodos descritos para la formación de hidrogeles físicamente reticulados son:

2.2.5.1.1 Interacción iónica

Las síntesis de estos hidrogeles se dan cuando un polímero iónico se combina con un ion multivalente de carga opuesta (ion metálico, molécula o polímero iónicos), estos hidrogeles se pueden reticular en condiciones suaves, condiciones fisiológicas y temperatura ambiente, no obstante, una de las grandes desventajas es que la tasa de gelificación es difícil de controlar, así como la uniformidad en la estructura (Elsayed, 2019).

2.2.5.1.2 Cristalización

La obtención de hidrogeles por cristalización se da mediante el uso de ciclos de congelación-descongelación en sistemas homopolímeros o por la formación de estereocomplejos, este sistema de síntesis implica la formación de microcristales en la estructura. Los estereocomplejos son otra forma de cristalización que se forman por interacciones estereoselectivas entre polímeros con estructura estereoregular (el grupo funcional se ubica solamente en un lado del monómero) complementaria que interaccionan formando un sistema de propiedades diferentes al de los constituyentes originales (Soto & Oliva, 2012).

2.2.5.1.3 Enlaces de hidrógeno

El enlace de hidrógeno se da entre un átomo de hidrógeno deficiente en electrones y una especie rica en electrones; sin embargo, la síntesis de hidrogeles por enlaces de hidrógeno puede realizarse por reducción del pH de soluciones acuosas de polímeros con grupos carboxilo, por lo que los enlaces hidrógeno solo se formarán cuando se protonen los grupos carboxilo, lo cual da a entender que los hidrogeles que se obtienen por este medio son dependientes del pH (Lim *et al.*, 2019).

2.2.5.2 Hidrogeles entrecruzados químicamente

Los hidrogeles que se polimerizan químicamente están reticulados mediante interacciones covalentes, por lo que son mucho más estables con mejores propiedades mecánicas en comparación con los hidrogeles físicamente reticulados; sin embargo, el problema de estos hidrogeles es que algunos de los agentes de reticulación usados pueden ser tóxicos. Los hidrogeles químicamente reticulados pueden obtenerse mediante polimerización radicalaria, grupos funcionales reactivos y polimerización por el método enzimático (Zafar *et al.*, 2022).

2.2.5.2.1 Polimerización radicalaria

Es la técnica de polimerización más utilizada, este método se utiliza para el desarrollo de hidrogeles biocompatibles a base de polímeros. Involucra el crecimiento en cadena donde el polímero se forma mediante la adición secuencial de grupos de radicales libres que actúan como moldes para la acumulación estructural. Esta síntesis presenta los siguientes pasos: iniciación, propagación, transferencia de cadena y terminación. Hay cuatro métodos de polimerización por radicales: en masa, en solución, suspensión y en emulsión (Mantha *et al.*, 2019).

2.2.5.2.2 Grupos funcionales reactivos

Esta técnica permite la síntesis de hidrogeles mediante interacciones covalentes entre los grupos funcionales de los polímeros ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$), los enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas se dan a través de reacciones típicas como la formación de base de Schiff, adiciones tipo Michael, enlaces peptídicos y reacciones tipo click (Varghese *et al.*, 2020).

2.2.5.2.3 Método enzimático

Las enzimas presentan un alto grado de especificidad por el sustrato, por lo que suprimen reacciones secundarias durante el proceso de reticulación, esto permite controlar la tasa global de entrecruzamiento y predecir la cinética de reticulación. Por tal motivo, este proceso de síntesis es el preferido para las reacciones de gelificación *in situ*, como es el caso de la reacción de oxidación catalizada por enzimas como la tirosina o peroxidasa que oxidan sustratos o formas reactivas y que presentan el potencial de formar enlaces covalentes. Estas reacciones enzimáticas ocurren en condiciones suaves, por lo que, no se producen sustancias nocivas (Song *et al.*, 2021).

2.2.6 Propiedades de los hidrogeles

Los hidrogeles presentan características particulares, como hidrofilia, elasticidad, hinchamiento, etc. Estas propiedades determinarán las posibles aplicaciones convirtiéndolos en un campo atractivo, especialmente en el campo de la biomedicina. A continuación, se explican las propiedades principales de los hidrogeles:

2.2.6.1 Mecánicas

Las propiedades mecánicas juegan un papel importante para las aplicaciones farmacéuticas y bioquímicas, por lo tanto es importante que el hidrogel mantenga su textura física durante la liberación del compuesto bioactivo; estas propiedades se pueden lograr al incorporar monómeros y reticuladores específicos, este último determinará en mayor medida las propiedades mecánicas ya que si se encuentra en proporciones mayores se obtiene un hidrogel con fuerte grado de reticulación, pero un grado demasiado alto de reticulación da como resultado una baja elasticidad, hinchamiento, capacidad de albergar el fármaco, etc., por tanto un grado óptimo de entrecruzamiento de hidrogeles es esencial para estudios o aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, al tener una resistencia mecánica adecuada, podrá mantener su textura física durante la liberación del fármaco en un periodo de tiempo específico (Bashir *et al.*, 2020).

2.2.6.2 Biocompatibilidad y biodegradabilidad

El estudio de la citotoxicidad del hidrogel es un punto muy importante para que este sea aplicable en el mundo biomédico, por lo tanto, el hidrogel debe presentar propiedades adecuadas de biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad para que sean compatibles con

el sistema fisiológico del cuerpo humano, por lo que, es crucial evaluar estos parámetros antes de usarlos en aplicaciones biomédicas. Básicamente la biocompatibilidad es la propiedad que presenta el hidrogel para trabajar de manera eficiente con los tejidos u órganos del ser vivo, por tal razón la bioseguridad y biofuncionalidad son elementos esenciales para la biocompatibilidad, los métodos utilizados para estudiar la biocompatibilidad incluyen pruebas de citotoxicidad, reacciones alérgicas, irritación, mutagénesis, implantación y hemocompatibilidad, por ejemplo para determinar la citotoxicidad se hacen estudios de cultivos celulares *in vitro* que permiten ver anomalías y degeneración en la morfología celular, así también para determinar la hemocompatibilidad se realiza la incubación del hidrogel en sangre total diluida, las sustancias tóxicas presentes tenderán a destruir las células sanguíneas liberando la hemoglobina en el medio, el contenido de hemoglobina libre establece la medida de hemocompatibilidad (Madduma-Bandarage & Madihally, 2021).

2.2.6.3 Contenido de agua en equilibrio

El hidrogel puede mantener el agua dentro de su red polimérica en una serie de estados como el agua libre que presenta una alta movilidad y no se ve influenciada por su entorno polimérico y el agua asociada, el cual presenta una interacción fuerte con la matriz de la red polimérica a través de enlaces puente de hidrógeno (Piechocki *et al.*, 2020).

Los geles de carácter hidrofílico tienen la propiedad de absorber grandes cantidades de agua, esto por estar formados por una matriz polimérica tridimensional que presenta grupos funcionales polares colgantes unidos a la red polimérica; mientras que, la resistencia a la disolución está determinada por una estructura de red reticulada. El comportamiento hidrofílico brinda una excelente biocompatibilidad por asemejarse a los tejidos biológicos. Las interacciones presentes entre el agua, la red polimérica y el fármaco determinan la cinética de liberación del principio activo durante el proceso de hinchamiento (Vesković *et al.*, 2023).

Al tener los hidrogeles la capacidad de retener grandes cantidades de agua dentro de la red polimérica, estos aumentan de tamaño y volumen, el proceso de absorción de agua en la matriz polimérica se conoce como hinchamiento del hidrogel, determinar el hinchamiento del hidrogel permite determinar otros parámetros como el grado de reticulación, propiedades mecánicas, así como la velocidad de degradación, por lo general la determinación de hinchamiento del hidrogel se determina por técnicas sencillas como la medición de la relación de hinchamiento y la pérdida de peso (Madduma-Bandarage & Madihally, 2021).

2.2.7 Hidrogeles inteligentes

Una de las características más importantes de numerosos hidrogeles es su capacidad de responder a estímulos externos (**Figura 3**), lo que les confiere la denominación de hidrogeles inteligentes. Estos materiales pueden responder a estímulos como el pH, temperatura y electricidad lo que provoca cambios rápidos en su comportamiento de hinchamiento y estructura de poros, otorgando a estos materiales características favorables como sistemas para la administración de principios activos autorregulados, incluidos péptidos y proteínas, el mecanismo que causa los cambios estructurales de la red puede ser completamente reversible (Peppas & Hoffman, 2020).

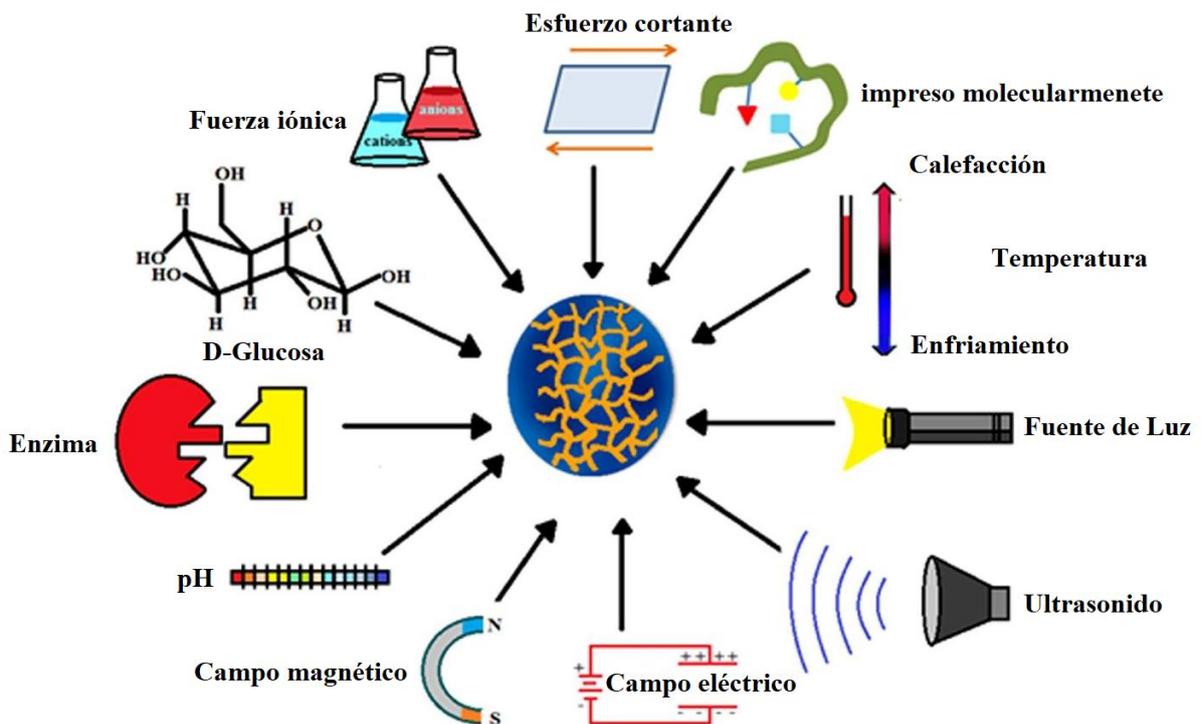


Figura 3: Estímulos externos que generan respuesta al hidrogel (Almawash *et al.*, 2022)

2.2.7.1 Hidrogeles sensibles a pH

Los hidrogeles pH-estímulo son los que sufren un cambio de manera repentina en su volumen o estructura debido a un cambio de pH en su entorno, estos hidrogeles generalmente comprenden una red con grupos ácidos y básicos ionizables unidos a la cadena polimérica el

cual puede protonar o desprotonar al sufrir en su entorno un cambio de pH (Mahinroosta *et al.*, 2018).

Cuando el polímero genera una respuesta al cambio de pH del medio se le llama polielectrolito, por lo que, los hidrogeles que presentan grupos funcionales ionizables juegan un papel importante con respecto a la variación de pH de su entorno y estos se pueden clasificar en dos grupos:

2.2.7.1.1 Poliácidos

Este grupo las cadenas poliméricas contendrán grupos funcionales capaces de ceder protones, estos poliácidos se mantendrán protonados si el pH del medio se mantiene bajo (pH ácido); sin embargo, si el pH del medio se incrementa (pH alcalino) con valores superior al pKa de los grupos ionizables aniónicos el polímero cederá protones, generando en consecuencia repulsión electrostática entre los grupos adyacentes. Los grupos funcionales más representativos son el ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), aunque los grupos sulfónico ($-\text{SO}_3\text{H}$) y fosfonato ($-\text{PO}_3\text{H}_2$) también presentan este comportamiento (**Figura 4**).

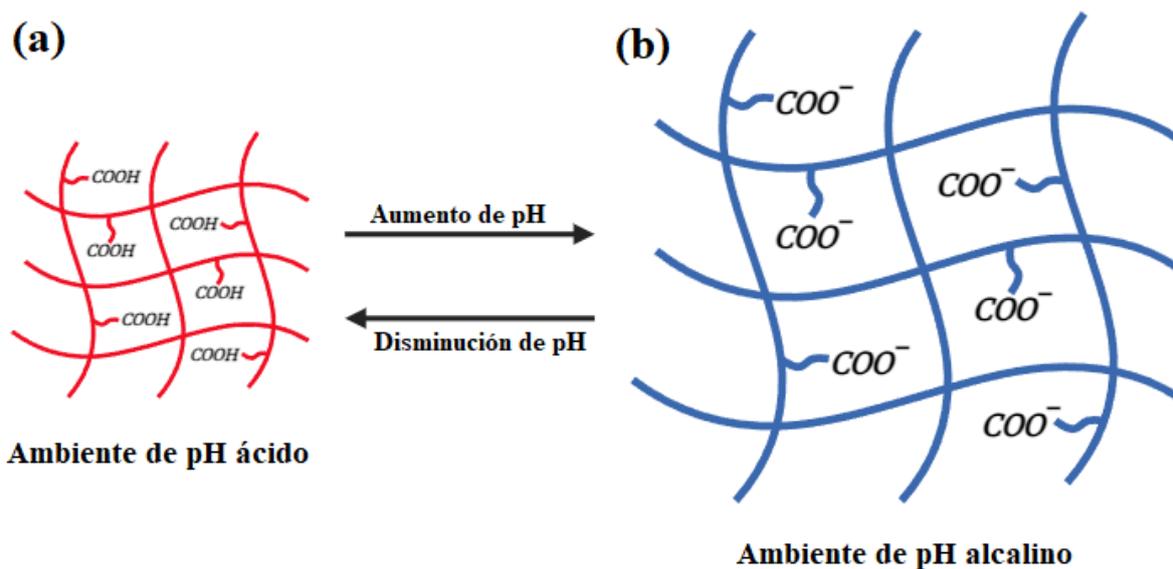


Figura 4: Grado de hinchamiento a pH básico, (a) a pH ácidos los grupos carboxílicos se encuentran protonados, (b) a pH alcalinos los grupos carboxílicos se desprotonan adquiriendo cargas negativas lo que induce al hinchamiento del hidrogel.

2.2.7.1.2 Polibases

Este grupo presenta un comportamiento opuesto al de los poliácidos. Cuando el pH del grupo ionizable catiónico ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NRNH}_2^+$, etc.) es inferior al pK_b , el hidrogel se hinchará (**Figura 5**) debido a la repulsión de las cargas electrostáticas. A diferencia de los grupos carboxílicos que aceptan protones en condiciones ácidas y ceden protones en condiciones básicas, los grupos catiónicos se comportan de manera diferente en función del pH (Rizwan *et al.*, 2017).

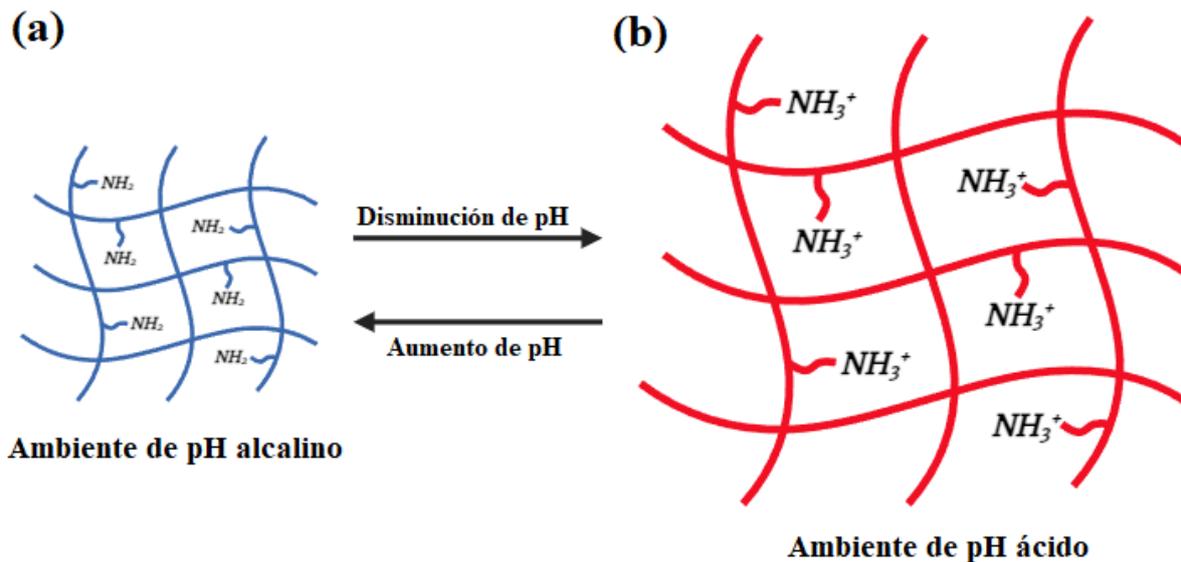


Figura 5: Grado de hinchamiento a pH ácido, (a) los grupos amino no se ionizan en un ambiente alcalino, (b) en un ambiente ácido por debajo de su pK_b , los grupos amino ionizan, provocando el hinchamiento del hidrogel por repulsión de cargas.

Estas propiedades de los grupos colgantes tienen una gran influencia en el hidrogel, ya que el cuerpo humano presenta diferentes valores de pH en cada tejido u órgano, por lo tanto, es importante determinar el pH adecuado para que el hidrogel reaccione para sus posibles aplicaciones biomédicas posteriores (Hilmi *et al.*, 2016).

2.2.8 Aplicaciones de los hidrogeles

La administración de fármacos en el organismo es comúnmente mediante la dosificación clásica conocida como formas farmacéuticas de liberación convencional (FFLI), donde el fármaco se libera de manera casi inmediata provocando un aumento de concentraciones plasmáticas máximas que en muchas ocasiones llega a originar efectos secundarios, esta

dosificación ira decayendo en función de la farmacocinética del mismo alcanzando niveles bajos ineficaces (**Figura 6**); por otra parte, en casos como la administración por vía oral las características de los principios activos hacen que la liberación se produzca en zonas no adecuadas disminuyendo en gran medida la eficacia terapéutica de la formulación. Las últimas investigaciones en hidrogeles se han centrado en el enfoque principal como sistemas para la administración de fármacos, para lograr liberaciones sostenidas a través del tiempo (Lee & Yeo, 2015).

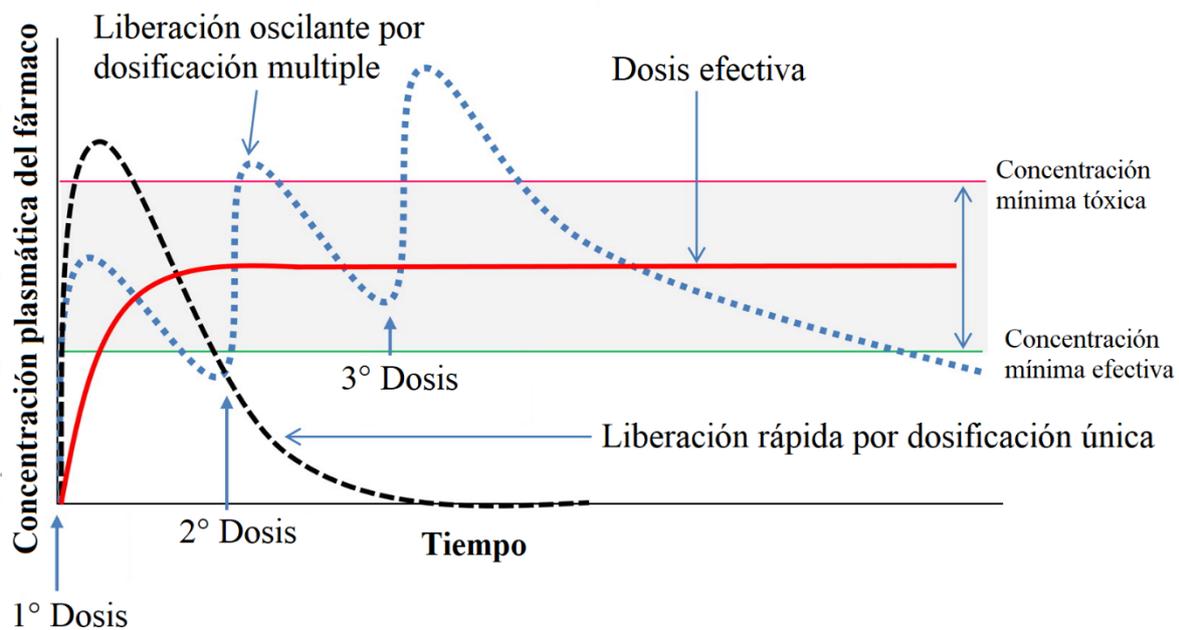


Figura 6: Perfil de liberación tradicional (línea discontinua) y liberación controlada (línea continua) (Lee & Yeo, 2015).

2.2.8.1 Capacidad de albergar fármacos

La capacidad de los hidrogeles para albergar fármacos se basa en mecanismos que incluyen la absorción del fármaco en la red tridimensional del hidrogel, así como diversas interacciones electrostáticas que estabilizan esta incorporación. Esto significa que cuando el hidrogel contiene grupos funcionales cargados como carboxilatos (COO^-) o aminas (NH_3^+) se producen atracciones iónicas con las moléculas del fármaco que poseen cargas opuestas facilitando al cargad entro de la matriz polimérica, por otra parte, si el fármaco presenta un dipolo eléctrico pueden formarse interacciones dipolo-carga o dipolo-dipolo lo cual aumentara la estabilidad del complejo fármaco hidrogel.

Además de los procesos de absorción dentro de la matriz polimérica, también se dan procesos de adsorción, esto consiste en que las moléculas del fármaco pueden adherirse a la superficie del hidrogel a través de fuerzas de Van der Waals (adsorción física) o mediante interacciones electrostáticas especialmente cuando el fármaco y el polímero tienen cargas opuestas, estos mecanismos en conjunto permiten que el hidrogel albergue fármacos o sustancias activas en su interior, la incorporación del principio activo al hidrogel se puede realizar por los siguientes métodos:

2.2.8.1.1 Cargado posterior a la formación del hidrogel.

Una vez obtenido el hidrogel, la carga del principio activo se da por absorción en caso el hidrogel presente ligandos de unión al fármaco, se deberá tener en cuenta la interacción polímero fármaco, tanto al momento de cargar el principio activo como en su liberación.

2.2.8.1.2 Cargado in situ.

El principio activo se mezcla con el polímero antes de la formación del hidrogel, por lo que tanto la gelificación como la encapsulación del principio activo se dará de manera simultánea a la formación del hidrogel. En este caso el sistema de liberación del principio activo se da por difusión, hinchamiento o control químico (Martínez Martínez, 2016).

2.2.8.2 Mecanismo de liberación desde hidrogeles

Los mecanismos de liberación controlada del agente activo desde la matriz polimérica se dan bajo sistemas de difusión, hinchamiento o químicamente (**Figura 7**).

2.2.8.2.1 Liberación controlada por difusión.

Es el método más común de liberación, el principio activo es liberado desde la zona de mayor concentración a través de los espacios existentes entre las cadenas poliméricas, denominadas poros hacia un ambiente externo de menor concentración. En este caso cuando el tamaño de los poros es mucho mayor que el tamaño del principio activo, el coeficiente de difusión está directamente relacionado con la porosidad, sin embargo, cuando el tamaño de poro es menor que el tamaño del principio activo el coeficiente de difusión disminuye debido al impedimento estérico causado por la red reticulada (Li, M. *et al.*, 2022).

2.2.8.2.2 Liberación controlada por hinchamiento.

Este caso se da cuando el fármaco está disperso en la matriz polimérica, por tanto, cuando el hidrogel está en un medio acuoso, el solvente ingresa dentro de los espacios libres formado por las cadenas macromoleculares, comenzando a hincharse, produciendo dos fases, una vítrea donde las moléculas permanecen inmóviles y otra plástica donde las moléculas difunden rápidamente, el fármaco será liberado cuando pase de la fase vítrea a la fase plástica.

2.2.8.2.3 Liberación controlada químicamente.

La liberación del principio activo está determinada por las reacciones que suceden dentro de la matriz polimérica, las reacciones más comunes son la ruptura de las cadenas por vía hidrolítica y por degradación enzimática, pudiendo ser reacciones reversibles o irreversibles (Martínez, 2017).

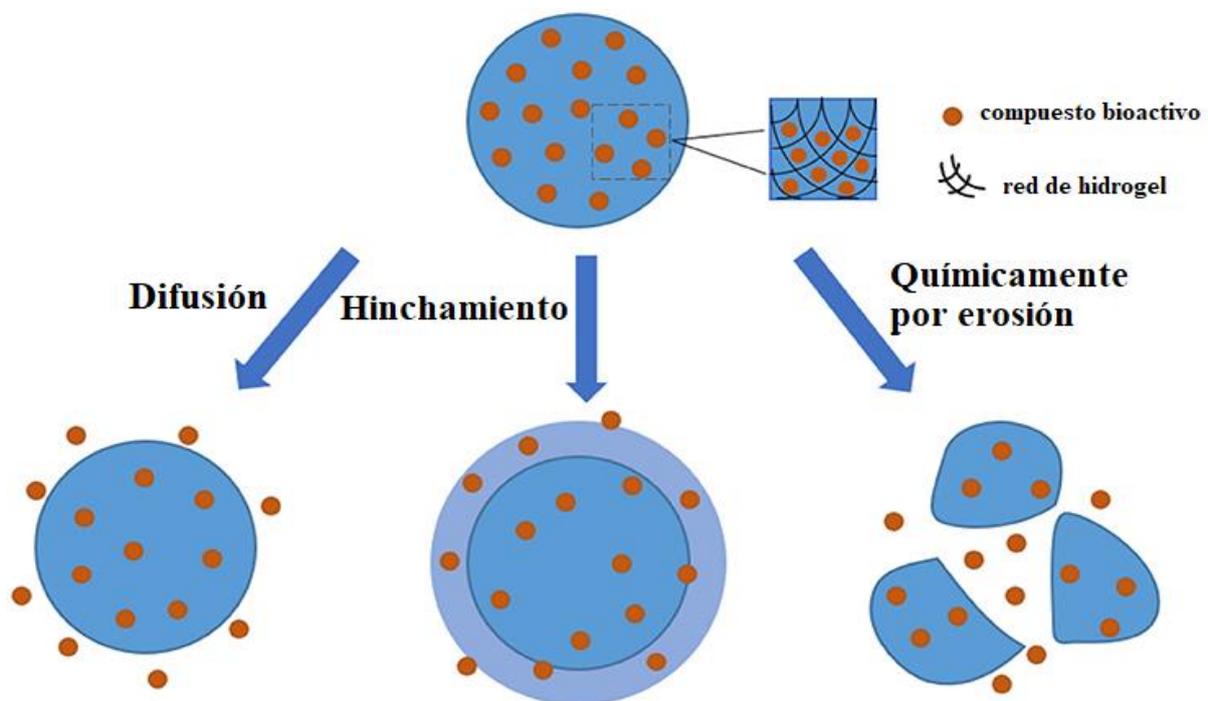


Figura 7: Esquema de liberación controlada por difusión, hinchamiento y químicamente a partir de hidrogel previamente cargado (Li, M. *et al.*, 2022).

2.2.9 Modelos matemáticos de cinética de liberación

La cinética de liberación puede ser estudiada por modelos matemáticos que permiten determinar los mecanismos de liberación del principio activo desde la red tridimensional del hidrogel, lo que ayuda a comprender los diferentes tipos de liberación y facilitar la comprensión para el diseño de nuevos materiales poliméricos como sistema de liberación modificada.

Al realizar el ajuste de datos experimentales del perfil de liberación del principio activo estos se pueden analizar mediante varios modelos matemáticos que relacionan la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo transcurrido, los cuales se explican a continuación:

2.2.9.1 Orden cero

El modelo matemático de orden cero considera una situación ideal de liberación continua del principio activo, por lo que, este modelo es producto del fenómeno de disolución independiente de la concentración, por lo tanto, esta liberación es constante y continua en el tiempo (Altun *et al.*, 2021), esta ecuación viene expresada como:

$$Q_t = C_0 + K_0 t$$

donde: Q_t es la cantidad de principio activo liberado en el tiempo t , C_0 es la concentración inicial de principio activo, K_0 es la constante de velocidad del modelo de orden cero.

2.2.9.2 Primer orden

A diferencia del modelo de orden cero, este modelo presenta una liberación dependiente de la concentración, en este modelo el principio activo se libera de manera proporcional a la cantidad de principio activo que hay en el interior de la matriz polimérica (Iyer *et al.*, 2021), esta ecuación viene expresada como:

$$\frac{dc}{dt} = K_1(C_t - C_0)$$

donde: dc/dt es la tasa de liberación de la droga en el tiempo t , K_1 es la constante de primer orden, C_t es la concentración en el tiempo t y C_0 es la concentración inicial.

2.2.9.3 Hixson-Crowell

Este modelo fue desarrollado considerando los sistemas que no permanecen constantes en términos de diámetro y superficie, esta ecuación también es conocida como ley de la raíz cubica bajo la premisa que el área regular de las partículas es proporcional a la raíz cubica de su volumen (Iyer *et al.*, 2021), esta ecuación viene expresado como:

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = Kt$$

donde: Q_t es la cantidad de liberación de principio activo en el tiempo t y Q_0 es la cantidad total de droga liberada y K es la constante del modelo matemático.

2.2.9.4 Higuchi

Este es un modelo semi empírico basado en la segunda ley de Fick, describe la liberación del principio activo de la matriz insoluble como la raíz cuadrada de un proceso dependiente del tiempo (Altun *et al.*, 2021), este modelo matemático viene expresado como:

$$Q_t = kt^{1/2}$$

donde: Q_t es la cantidad de principio activo liberado en el tiempo t , k es la constante de disolución de Higuchi.

2.2.9.5 Korsmeyer-Peppas

Este modelo matemático se utiliza para analizar la liberación del principio activo desde la matriz polimérica cuando el mecanismo de liberación no es conocido o cuando hay más de un fenómeno de transporte involucrado, esta ecuación viene expresada como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

donde: M_t/M_∞ es la fracción de principio activo liberado en el tiempo t , k es la constante de liberación de Korsmeyer-Peppas y n es el exponente de liberación que indica el mecanismo de velocidad de liberación.

Para valores de $n \leq 0,45$ indica que la liberación es por difusión de Fick, valores de $n = 1$ indica que la liberación está controlada por procesos de relajación de las cadenas poliméricas,

este perfil de liberación se ajusta al modelo cinético de orden cero, para valores de n comprendidos entre 0,45 y 1 indica que en la liberación influye tanto la difusión como la relajación, por lo que se denomina transporte anómalo, el cual se puede estudiar empleando la difusión no Fickiana (Altun *et al.*, 2021).

2.2.10 Caracterización de hidrogeles

2.2.10.1 Espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR)

La técnica de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier es una técnica preferida por los investigadores debido a su alta precisión, velocidad, sensibilidad y facilidad de operación. La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) utiliza la propiedad de reflexión interna total de un cristal trapezoidal de alto índice de refracción que cuando pasa a través de un haz de infrarrojos da como resultado una onda evanescente, la muestra se coloca directamente sobre la superficie del cristal para que pueda absorber la onda evanescente que penetra en ella entre 0,5 y 2 μm . La reflexión total del haz infrarrojo en el elemento de reflexión interna se debe a la pendiente de la luz incidente que está por encima del ángulos crítico y depende del índice de refracción del material, normalmente los experimentos se realizan utilizando luz polarizada (**Figura 8**) (Ausili *et al.*, 2015).

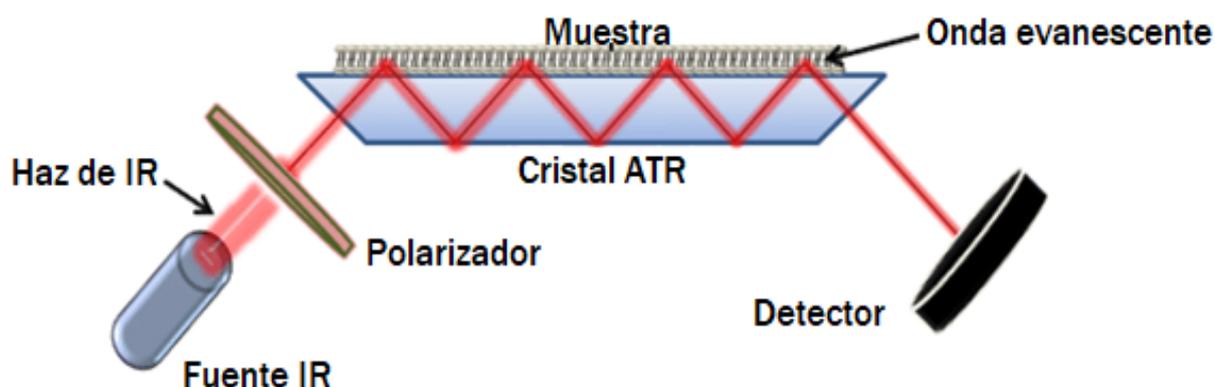


Figura 8: Representación esquemática de un sistema ATR-FTIR (Ausili *et al.*, 2015).

2.2.10.2 Espectroscopia RAMAN

La espectroscopía Raman es una técnica de espectroscopía vibracional molecular, que puede identificar las propiedades y estructuras de las distintas muestras analizadas mediante la

información de huellas dactilares de las moléculas. Se descubrió en 1928 por el erudito Chandrasekhara Venkata Raman, quien se dio cuenta que, cuando la luz monocromática de frecuencia fija incide sobre un medio, ocurren simultáneamente dos procesos de dispersión: uno es la dispersión Rayleigh (λ dispersado = λ monocromático) que presenta frecuencia constante a la luz incidente, y es causado por las colisiones elásticas entre los fotones incidentes y la materia, y la otra es la dispersión Raman con cambio de frecuencia (λ dispersado \neq λ monocromático), fenómeno causado por el intercambio de energía, que ocurre cuando los fotones incidentes chocan con el medio lo cual provoca un cambio en los niveles de energía rotacional o vibratoria de las moléculas (**Figura 9**) (Liu *et al.*, 2022).

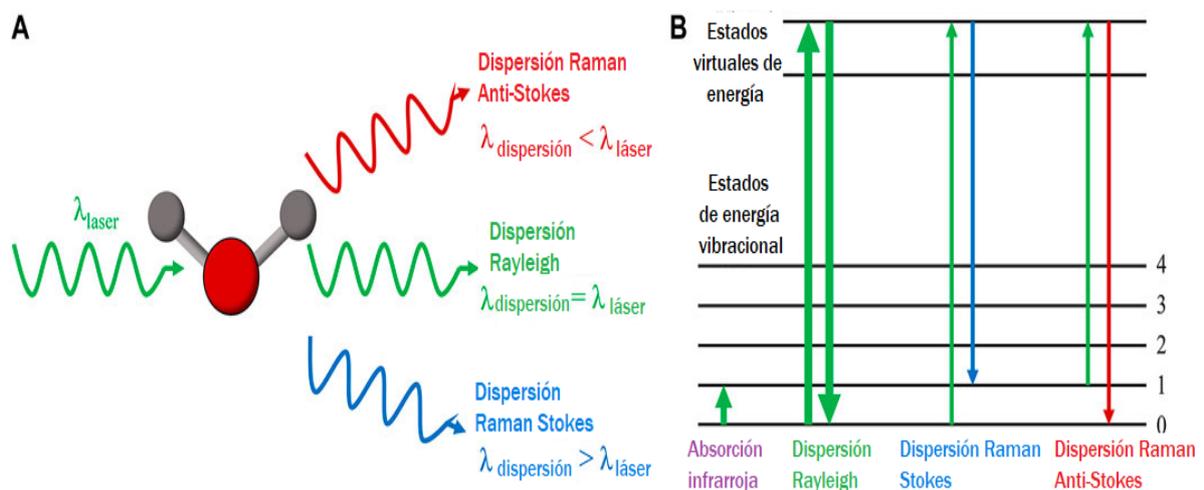


Figura 9: Principio de la dispersión Raman (A) dispersión RAMAN y Rayleigh; (B) niveles de energía de dispersión Raman, Rayleigh y absorción infrarroja (Liu *et al.*, 2022).

2.2.10.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (**Figura 10**) es uno de los instrumentos más utilizados por los científicos, permite agrandar la imagen de pequeñas características físicas, morfológicas o estructurales de objetos que no son invisibles para el ojo humano. Este proceso se da mediante el uso de un haz de electrones, el cual se produce a través del calentamiento de un filamento de tungsteno, la interacción entre los electrones incidentes y los átomos de la superficie de la muestra generan electrones retrodispersados, electrones secundarios y otras señales que transmiten información topográfica. Un SEM convencional funciona en condiciones de alto vacío, requiere que las muestras estén limpias, secas y sean conductoras; sin embargo, gran parte de las muestras son no conductoras y para evitar la acumulación de carga estática deben volverse eléctricamente conductores, para lo cual se produce impregnaciones con materiales

conductores revistiéndoles con una lámina delgada (Shah *et al.*, 2019). A diferencia de los microscopio ópticos que presentan una resolución de $0,25 \mu m$ con una ampliación máxima de $1000X$ y el tipo de lentes usado de vidrio, los microscopios electrónicos de barrido presentan una resolución de $0,05 nm$ con una ampliación máxima de $1,000,000X$ y el tipo de lente electromagnéticas (Vernon-Parry, 2000; Temiz, 2022).

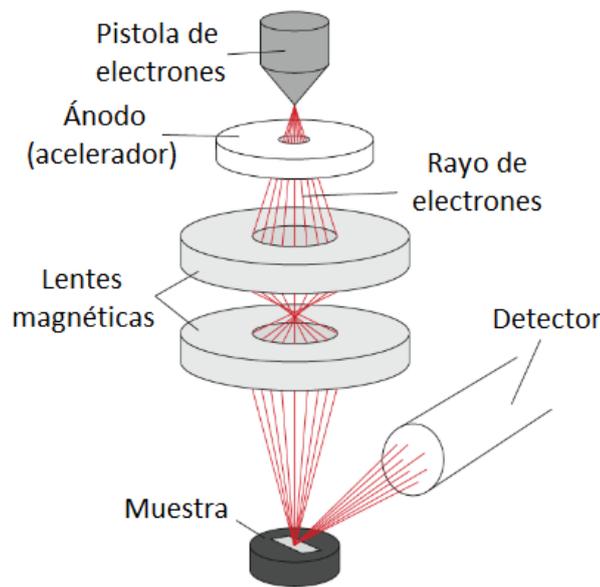


Figura 10: Representación esquemática de un microscopio electrónico de barrido (University of Cambridge, 2015).

2.2.10.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico sirve como herramienta para entender los comportamientos de los polímeros cuando estos son sometidos a calentamiento (estabilidad térmica) en condiciones de temperatura y velocidad de calentamiento predeterminadas, la técnica proporciona datos cualitativos y cuantitativos de la cinética de pérdidas de masa de las muestras por degradación con respecto al cambio de temperatura, así como el comportamiento de los polímeros (Parameshwaran *et al.*, 2018), el aparato de termogravimetría (**Figura 11**) consisten en un equilibrio físico donde la balanza analítica se considera el corazón de la unidad del equipo termogravimétrico capaz de proporcionar información cuantitativa, el horno donde se encuentra situado el soporte de la muestra, un sistema de gas de purga que por lo general es gas argón o nitrógeno necesarias para desplazar el aire de la cámara y evitar la oxidación de la

misma y un microprocesador para el control de instrumento y procesamiento de datos (Loganathan *et al.*, 2017).

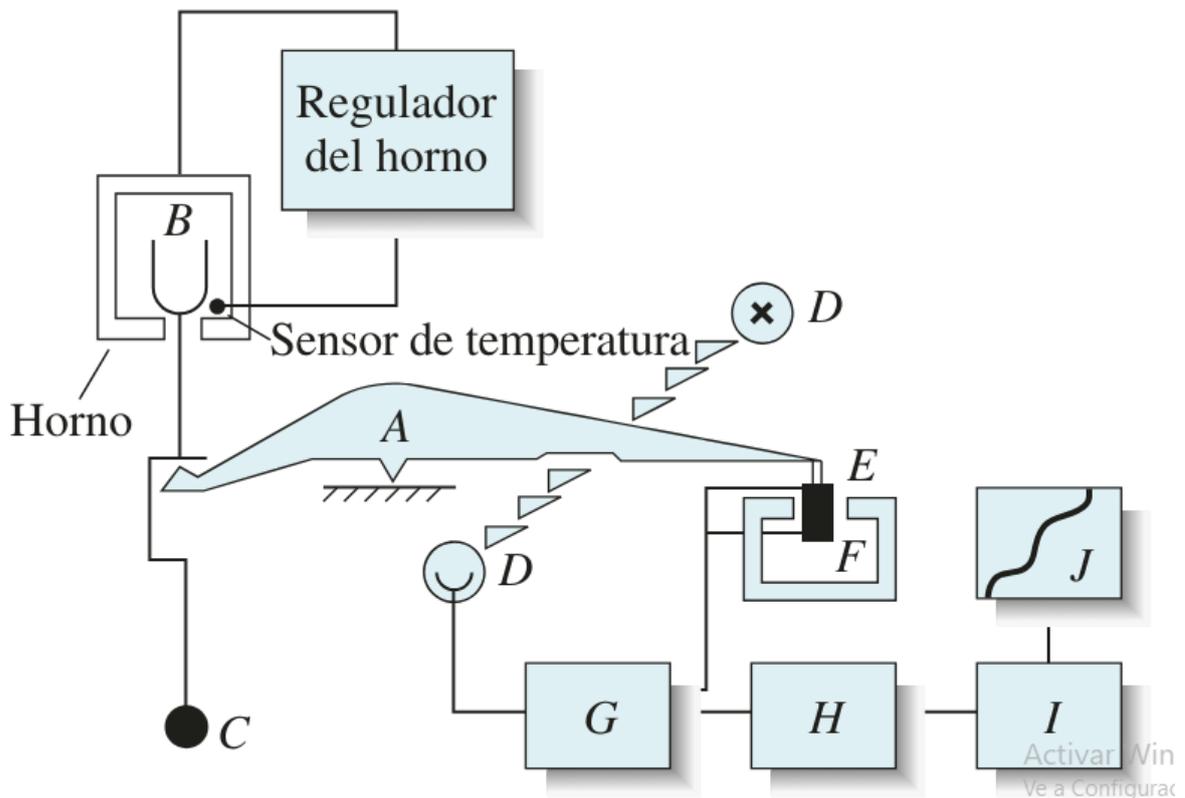


Figura 11: Diagrama de una termobalanza: A: barra; B: soporte y recipiente para la muestra; C: contrapeso; D: lámpara y fotodiodos; E: bobina; F: imán; G: amplificador de control; H: calculador de tara; I: amplificador; y J: registrador (Skoog *et al.*, 2014).

2.2.10.5 Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X es una técnica no destructiva muy versátil usada comúnmente para el análisis de propiedades físicas, composición de fase y sobre todo para la caracterización estructural de materiales en función de su patrón de difracción, el difractómetro de rayos X consta principalmente de tres elementos: una fuente de rayos X, un soporte de muestra y un detector (**Figura 12**), el funcionamiento básicamente inicia con la fuente de iluminación la cual se difracta en la fase de la muestra y entra en el detector, los rayos X dispersos interfieren constructivamente entre si, esta interferencia se puede analizar utilizando la ley de Bragg-Brentano para determinar varias características de los materiales. En los sistemas de administración de fármacos se puede utilizar para la caracterización y composición

de las estructuras físicas (amorphas y/o cristalinas) de los principios activos (Gumustas *et al.*, 2017; Uzun, 2023).

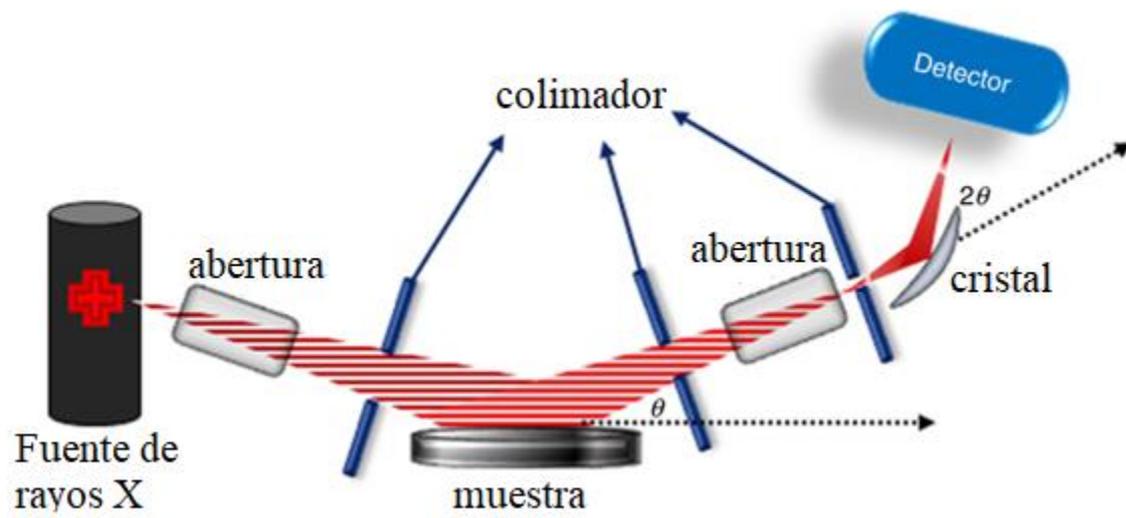


Figura 12: Ilustración de difracción de rayos X (DRX) (Gumustas *et al.*, 2017).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Formulación de hipótesis

El uso de ácido itacónico (AI) en la preparación de hidrogeles pH-sensibles a base de HEMA con PEGxMEM permite la síntesis de hidrogeles que en condiciones ácidas se mantienen comprimidos, mientras que en condiciones básicas se hinchan. Estas propiedades facilitan el transporte y la liberación controlada de ácido ursólico al sitio de absorción, mejorando su biodisponibilidad.

3.2 Diseño metodológico

3.2.1 Tipo de investigación

En el presente trabajo de investigación se sintetizó y caracterizó hidrogeles HGx para evaluar su potencial como sistema de transporte de AU. Se realizaron experimentos utilizando espectroscopia FTIR y RAMAN para analizar la estructura de los hidrogeles y se evaluó las propiedades de carga y liberación de AU, por lo tanto, este estudio se clasifica como **experimental** por la manipulación de variables y la observación en el comportamiento del hidrogel. Además, el enfoque es **cuantitativo** debido a la medición numérica de las propiedades del hidrogel y la liberación del ácido ursólico.

3.2.2 Diseño de investigación

Este estudio emplea un enfoque **experimental** para evaluar el comportamiento del hidrogel en diferentes rangos de pH, así como su capacidad para cargar y liberar ácido ursólico bajo condiciones simuladas del sistema gastrointestinal. La parte **descriptiva** se centrará en caracterizar el hidrogel mediante el uso de técnicas espectroscópicas de FTIR-ATR y espectroscopía RAMAN junto con el análisis SEM para dilucidar el comportamiento, estructura y morfología del hidrogel.

3.2.3 Operacionalización de variables

TIPO DE VARIABLES	VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	MEDICION	JUSTIFICACIÓN
Independiente	Formulación de hidrogeles HGx	Polimerización de los monómeros PEGxMEM, HEMA, AI con MBA como agente reticulante.	- Proporción de monómero - Condiciones de polimerización	- FTIR - RAMAN	La composición química se verifica con FTIR y RAMAN, el rendimiento se mide en porcentaje.
Dependiente	Capacidad de HGx para liberar AU	Porcentaje de AU liberado bajo condiciones específicas de pH (2,2 y 7,4)	- % de AU liberado	- Ensayo de liberación <i>in vitro</i>	El porcentaje de liberación está basado en las pruebas experimentales <i>in vitro</i> .
Controlada	Temperatura	Mantener condiciones de temperatura constantes.	- Temperatura (37 °C)	- Cámara de incubación	Esto asegura que las variaciones en los resultados se deben a las variables independientes y no a los cambios de temperatura.
Fija	Concentración de AU cargado	Cantidad específica de AU en el HGx	- % de AU en HGx - EE - EC	Espectroscopia UV-VIS	Mantener una concentración fija garantiza la consistencia en la cantidad de ácido ursólico cargado en cada muestra del hidrogel.
Interviniente	Cambio de pH	Comportamiento de hinchamiento frente a cambios de pH.	- Grado de hinchamiento. - Tamaño de poros.	- % Hinchamiento - DRX - SEM	El hinchamiento y la morfología están influenciados por los cambios de pH los cuales pueden influir en la liberación del ácido ursólico, por lo que es crucial monitorear estos aspectos durante el estudio.

3.2.4 Reactivos

Los monómeros utilizados en la síntesis de hidrogeles fueron:

- 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA, 97 %, Sigma-Aldrich, contiene ≤ 250 ppm de monometil éter hidroquinona como inhibidor).
- Polietilenglicol metiletermetacrilato (PEG₅MEM, promedio de Mn 300, Sigma-Aldrich, contiene 100 ppm de MEHQ y 300 ppm de BHT como inhibidores).
- Polietilenglicol metilétermetacrilato (PEG₉MEM, promedio de Mn 500, Sigma-Aldrich, contiene 200 ppm de BHT y 100 ppm de MEHQ como inhibidores).
- Acido itacónico (IA, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich).
- El agente reticulante utilizado fue N,N'-metilenbisacrilamida (MBA, 99 %, Sigma-Aldrich) y el iniciador 1-hidrox ciclohexil fenilcetona (HCPK, 99 %, Sigma-Aldrich).

Para simular las condiciones gastrointestinales *in vitro* se usó TWEEN 80, tampón pH 2,2 (KCl:HCl) y tampón de fosfatos (PBS) pH 7,4 (NaCl:KCl:Na₂HPO₄:KH₂PO₄). Los disolventes etanol, metanol y agua fueron destilados antes de ser utilizados.

3.2.5 Equipos

Los instrumentos que se utilizaron durante el trabajo fueron los siguientes: balanza analítica (Gram FV, modelo FV-220C), campana extractora de gases, cámara de fotopolimerización, estufa (memmert), pHmetro (Crison - Model PH 25 Plus - pH-Meter – Datasheet), rotaevaporador (RE100-Pro), espectrómetro infrarrojo Perkin Elmer con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR, Thermo, Nicolet 380, USA), Liofilizador, Microscopio electrónico de barrido (SEM, XL30ESEM Philips, North Billerica, MA, USA), Microscopio Raman confocal (Renishaw InVia Raman Microscope, S/N 9W596, Gloucestershire, UK), espectrómetro ultravioleta-visible UV-VIS (Thermo Scientific-Genesys 150, Waltham, MA, USA), analizador termogravimétrico (TGA, Perkin Elmer STA6000/Waltham, MA, USA), difractor de rayos X (XRD-BRUKER D8-ADVANCE S/N 203691 SAP 604310, Germany, Cu, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) y cromatógrafo HPLC (Thermo Scientific, Ultimate 3000Thermo, California, USA).

CAPITULO IV

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Química Inorgánica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC). En este laboratorio se realizó la obtención del ácido ursólico, así como la síntesis de hidrogeles y su posterior caracterización fisicoquímica. Además, se evaluó la eficiencia de carga, encapsulación y liberación del ácido ursólico. El análisis instrumental de los hidrogeles se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC) en Madrid, España.

4.1 Obtención de ácido ursólico

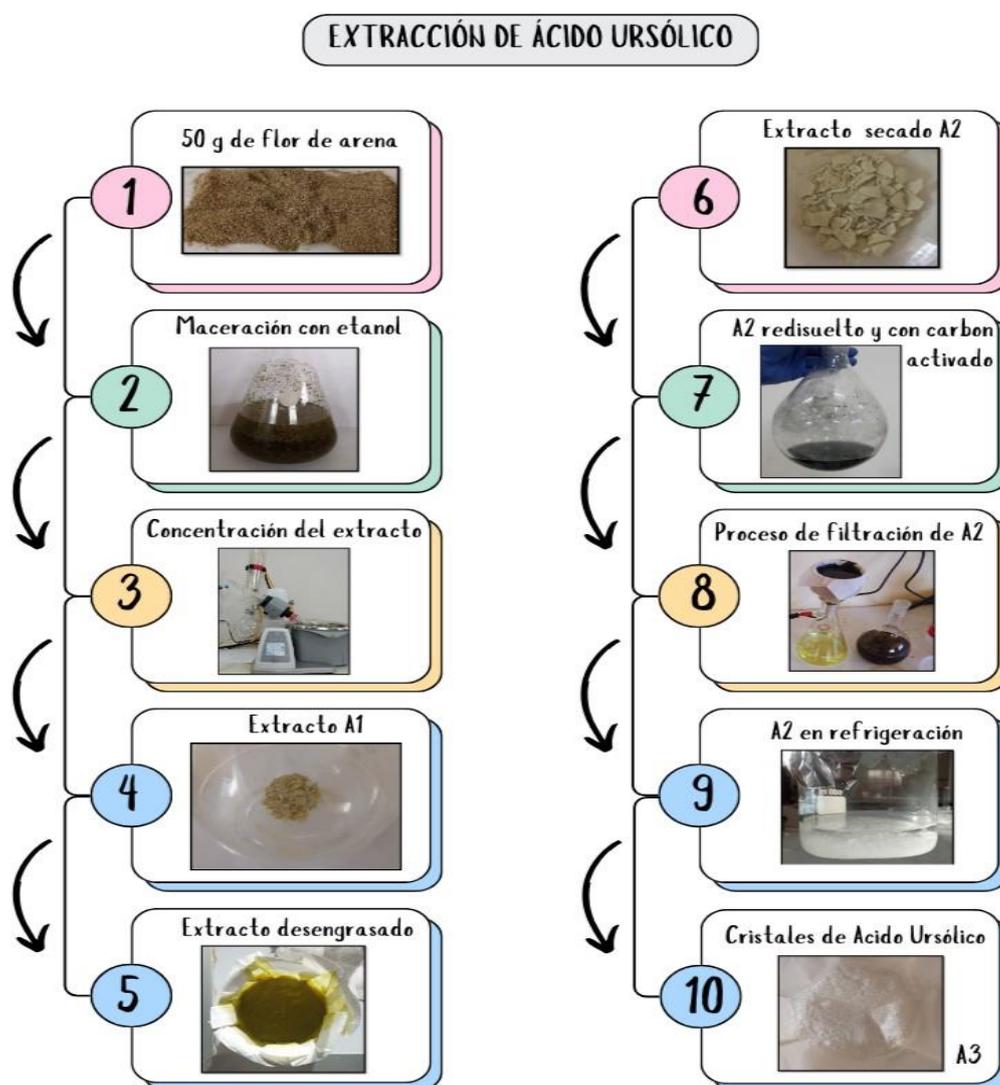


Figura 13: Proceso de obtención de ácido ursólico.

La muestra utilizada fue *Clinopodium revolutum*, esta muestra se colectó en el departamento de Huánuco en el cerro Sullcapunta a 3770 msnm. Las herboristerías de Lima, Cusco y Huancayo que comercializan este producto también son provenientes de esta región y es vendida bajo el nombre de Flor de arena (Ludeña *et al.*, 2021).

La obtención del ácido ursólico se desarrolló siguiendo la metodología propuesta por Ludeña *et al.* (2021). Las hojas secas de flor de arena (50 g), fueron maceradas en etanol al 96 % (200 mL) a temperatura ambiente durante 24 h. Después de este periodo, el extracto fue filtrado y las hojas se sometieron nuevamente a maceración bajo las mismas condiciones, este proceso fue repetido tres veces. El extracto etanólico obtenido fue concentrado a sequedad con la ayuda de un rotaevaporador. Luego, fue desengrasado con éter de petróleo (50 mL), por tres veces. El extracto desengrasado fue redisoluto en etanol 96 % (150 mL) y se mantuvo en refrigeración durante 24 h. El precipitado obtenido fue filtrado y secado en la estufa a 60° C durante 5 h. El proceso de cristalización fue realizado en etanol al 96 % (90 mL) a 60 °C, para decolorar la solución se añadió carbón activado (5 g) y se mantuvo en agitación constante por un periodo de 5 min. Luego, fue filtrado con ayuda de una bomba de vacío, el filtrado obtenido se dejó cristalizar, en refrigeración durante 12 h. Finalmente, los cristales obtenidos de ácido ursólico fueron filtrados, lavados con etanol frío y secados en una estufa a 60 °C durante 1 h.

4.2 Síntesis del hidrogel

4.2.1 Síntesis de hidrogeles HG₅ y HG₉

La síntesis de los hidrogeles basado en poli(HEMA-PEGxMEM-AI) (HGx) se realizó según la metodología propuesta por Gallardo *et al.* (2017). Los monómeros AI, HEMA, PEGxMEM y el reticulante MBA fueron pesados y disueltos en etanol (300 µL), esta mezcla fue sometida a agitación constante durante 5 min a 40 °C. Posteriormente se burbujeó con nitrógeno gas por un periodo de 10 min, para eliminar el oxígeno. Finalmente, se le añadió el agente iniciador 1-hidroxiciclohexil fenilcetona (HCPK) a la disolución. La mezcla resultante se inyectó de manera inmediata en un molde previamente preparado y se introdujo en la cámara de fotopolimerización (4 watts, 365 nm) donde se mantuvo durante 40 min. Terminado este tiempo los hidrogeles fueron retirados del molde y se cortaron en pequeños filmes cuadrados. La purificación de los hidrogeles se realizó sumergiendo los filmes en agua destilada, durante dos días, para eliminar las sustancias que no reaccionaron, el agua destilada se cambió dos veces al día con agua destilada nueva. Finalmente, los hidrogeles fueron secados a temperatura

ambiente hasta obtener peso constante. La cantidad de reactante que fue utilizado estuvo en función del porcentaje molar del total de monómeros monofuncionales presentes en la síntesis de los hidrogeles tal como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Cantidad de reactantes utilizados en la síntesis de hidrogeles.

HIDROGEL	HEMA g (mol%)	PEG₅MEM g (mol%)	PEG₉MEM g (mol%)	AI g (mol%)	MBA g	HCPK g
HG₅	0,800 (80%)	0,230 (10%)	-	0,100 (10%)	0,035	0,0156
HG₉	0,800 (80%)	-	0,384 (10%)	0,100 (10%)	0,035	0,0156

4.2.2 Síntesis de hidrogeles cargados *in situ* con ácido ursólico HG_x-AU

La síntesis de estos hidrogeles HG_x-AU fue realizado de manera similar al descrito anteriormente, con la única diferencia de que se incorporó ácido ursólico (1%) en el proceso. La cantidad de reactante que se utilizó está en función del porcentaje mol (mol %) del total de monómeros monofuncionales presentes en la síntesis de los hidrogeles ver **Tabla 2**.

Tabla 2: Cantidad de reactantes utilizados en la síntesis de hidrogeles.

HIDROGEL	HEMA g (mol%)	PEG₅MEM g (mol%)	PEG₉MEM g (mol%)	AI g (mol%)	AU g	MBA g	HCPK g
HG₅-AU	0,800 (80%)	0,230 (10%)	-	0,100 (10%)	0,035	0,023	0,0156
HG₉-AU	0,800 (80%)	-	0,384 (10%)	0,100 (10%)	0,035	0,023	0,0156

4.3 CARACTERIZACIÓN INSTRUMENTAL

4.3.1 Análisis HPLC

La pureza del ácido ursólico obtenido de la flor de arena fue determinado mediante HPLC (columna Phenomenex RP-C18 de 250 x 4,6 mm y 5 μm), las condiciones de análisis fueron las siguientes: una fase móvil de agua:acetonitrilo (2:8), una velocidad de flujo de 1 mL/min, modo de elución isocrático, inyección 5 μL y una longitud de onda de detección de 210 nm. Este análisis fue determinado en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

4.3.2 Caracterización por FTIR-ATR

La caracterización espectroscópica del hidrogel se realizó con el espectrómetro infrarrojo Perkin Elmer con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). Las muestras fueron previamente secadas a temperatura ambiente hasta obtener peso constante para ser colocadas en el cristal de ATR. La lectura se realizó a temperatura ambiente en un rango de número de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

4.3.3 Microscopía RAMAN

El microscopio RAMAN confocal integrado con microscopía de fuerza atómica en un microscopio CRM-alpha 300 RA equipado con un láser de colorante Nd/YAC (potencia máxima de salida de 50 mW) fue usado como técnica complementaria. Los espectros RAMAN fueron analizados punto por punto con un paso de 100 nm para lo cual previamente fueron secados los hidrogeles a temperatura ambiente para posteriormente colocarlos sobre la platina.

4.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) de los hidrogeles se realizó en un instrumento Perkin Elmer STA6000, se utilizaron 10 mg de hidrogeles previamente secados y molidos, la rampa de calentamiento fue desde 37 $^{\circ}\text{C}$ a 600 $^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en atmosfera inerte de nitrógeno gas con un caudal de 20 mL/min.

4.3.5 Análisis de difracción de rayos X (DRX)

Los hidrogeles cargados con ácido ursólico fueron analizados mediante difracción de rayos X (DRX-BRUKER D8-ADVANCE) con radiación de Cu, $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$. Se utilizaron hidrogeles que fueron previamente secados y molidos, estos se analizaron en un rango de $2\theta = 5^\circ - 80^\circ$.

4.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los hidrogeles fue analizada por un microscopio electrónico de barrido (SEM), para lo cual fueron liofilizados por un periodo de 12 h, hidrogeles hinchados en solución tampón de pH 2,2 y pH 7,4 a temperatura de 37°C , por un periodo de 24 h. Los hidrogeles tuvieron que ser metalizados con una aleación Au/Pd (80/20) con el fin de volverlas conductoras y así permita su observación en el microscopio.

4.4 Caracterización fisicoquímica de HGx

4.4.1 Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento (% R) fue determinado mediante el método gravimétrico, para lo cual se usó la **Ecuación (1)** (Çavuş & Çakal, 2012)

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_o}{W_t} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde W_o es el peso del gel seco y W_t es el peso del total de monómeros HEMA, PEGxMEM y AI y el reticulante MBA utilizados en la preparación de los hidrogeles.

4.4.2 Comportamiento de hinchamiento

El comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles se expresó como grado de hinchamiento (q). Para esto se pesaron 20 mg de hidrogel seco (W_0) y se sumergieron en 30 mL de cada uno de los siguientes líquidos: agua, etanol y metanol a temperatura ambiente con el fin de evaluar el mejor medio de hinchamiento. Después de la inmersión, los hidrogeles fueron retirados del líquido en el que fueron sumergidos y se secaron cuidadosamente, es importante secar con mucho cuidado la superficie del hidrogel con papel toalla antes de ser pesados (W). El grado de hinchamiento se determinó cada hora hasta alcanzar las primeras 10 h y luego cada 24 h. Este estudio fue realizado por triplicado y fue calculado con la **Ecuación 2** (He *et al.*, 2019).

$$q = \frac{W - W_0}{W_0} \quad \text{Ecuación (2)}$$

4.4.3 Respuesta al pH

Para evaluar la respuesta al pH de los hidrogeles, se determinó el grado de hinchamiento en diferentes soluciones tampón (2 a 10) a 37 °C. La respuesta al pH se expresó como grado de hinchamiento (q) y fue calculado con la **Ecuación 2** (He *et al.*, 2019), esta prueba consistió en sumergir el hidrogel seco previamente pesado (W_0) en una solución tampón de pH 2 durante 24 h. Pasado este intervalo de tiempo, se retiró el hidrogel sumergido y se procedió a secar su superficie con papel toalla para proceder a pesarlo (W pH 2). El mismo hidrogel se volvió a sumergir en una solución tampón de pH 3 por un tiempo de 24 h, para posteriormente secarlo con papel toalla y pesarlo (W pH 3). Se repitió este procedimiento hasta alcanzar el pH 10.

De la misma forma, se determinó la respuesta al pH simulando las condiciones gastrointestinales. Para ello, se sumergió el hidrogel seco previamente pesado (W_0) en una solución tampón de pH 2,2 a temperatura de 37 °C, durante 24 h (tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio). Pasado este intervalo de tiempo, se retiró el hidrogel sumergido y se procedió a secar su superficie con papel toalla para proceder a pesarlo (W). Posteriormente, el mismo hidrogel se volvió a sumergir en una solución tampón de pH 7,4 a temperatura de 37 °C durante 24 h. Tras la inmersión se secó con papel toalla y se pesó nuevamente. Este procedimiento se repitió de manera cíclica hasta que se observó la sobresaturación del hidrogel.

4.5 Eficiencia de carga y encapsulación

4.5.1 Carga de ácido ursólico mediante absorción

Para la carga del ácido ursólico mediante absorción se pesaron 50 mg de hidrogel y se sumergieron en 5 mL de solución metanólica de ácido ursólico (1 mg/mL) durante 24 h. Después de este tiempo el hidrogel se retiró de la solución y se lavó con metanol para eliminar el AU no absorbido. Finalmente, el hidrogel se dejó secar a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante.

4.5.2 Cargado *in situ* de ácido ursólico

La carga de ácido ursólico dentro de la red polimérica fue realizada mediante el método de cargado *in situ*, esta metodología implica la carga del ácido ursólico durante la formación del hidrogel, esta síntesis está descrita en la **Sección 4.2.2** de síntesis de hidrogeles incorporando ácido ursólico.

Para determinar la cantidad de ácido ursólico cargado en la matriz del hidrogel, se pesó 20 mg del hidrogel cargado *in situ*, así como, del hidrogel cargado por absorción. Luego, fueron sumergidos en 5 mL de metanol por un periodo de 24 h. Después de este periodo de tiempo, los hidrogeles fueron sometidos a ultrasonido por 1 h. Para determinar la concentración de ácido ursólico en la solución metanólica se utilizó un espectrómetro UV-VIS configurado a 210 nm. Se preparó previamente una curva de calibración utilizando una serie de soluciones metanólicas de AU con concentraciones que varían de 5 µg/mL a 100 µg/mL la concentración de ácido ursólico se determinó mediante comparación de las absorbancias obtenidas con la curva de calibración.

La eficiencia de carga y encapsulación de ácido ursólico fue determinado por las siguientes **Ecuaciones 3 y 4**. (Das *et al.*, 2017)

$$\text{Eficiencia de carga (EC)} = \frac{\text{masa del AU}}{\text{masa del hidrogel}} \times 100 \% \quad \text{Ecuación (3)}$$

$$\text{Eficiencia de encapsulación (EE)} = \frac{\text{masa del AU}}{\text{masa de AU inicial}} \times 100 \% \quad \text{Ecuación (4)}$$

4.6 Liberación controlada *in vitro*

El estudio de liberación de ácido ursólico fue realizado simulando las condiciones del sistema gastrointestinal. Para lo cual, se preparó una solución de tampón de pH = 2,2 que contenía Tween 80 (3 %) para simular el pH estomacal y para simular la condición intestinal se realizó la liberación en una solución tampón de pH 7,4 (PBS) con Tween 80 (3 %).

El perfil de liberación fue estudiado con 20 mg de hidrogel previamente cargado (*carga in situ*) a una temperatura de 37 °C en 5 mL solución tampón de pH 2,2 (pH estomacal), a intervalos de tiempo predeterminados 1h, 5h, 10h, 24h, 72h y 120h, se extrajo el hidrogel y se lavó la

superficie con agua destilada. Luego este fue sumergido en 5 mL de metanol durante 24 h y posteriormente se sometió a ultrasonido por 1 h, se retiró el hidrogel y la solución metanólica fue leída en el espectrómetro UV-VIS a una longitud de onda de 210 nm. La concentración fue determinada con la absorbancia y la ecuación de la curva de calibración previamente calculada.

La liberación simulando el pH intestinal (PBS, pH 7,4) se realizó a temperatura de 37 °C para lo cual, se sumergió 20 mg de hidrogel en 5 mL de PBS que contenía Tween 80 (3 %), a intervalos de tiempo predeterminados 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 24h, 48h, 72h, 96h y 120h se extrajo el hidrogel y se procedió a sumergir en 5 mL de metanol por un periodo de 24 h, pasado este tiempo se sonicó la muestra por 1 h y fue leída en el espectrómetro UV-VIS a una longitud de onda de 210 nm. La concentración fue determinada con la absorbancia y la ecuación de la curva de calibración previamente calculada.

La determinación de la cinética de liberación se realizó por triplicado y se informó como el porcentaje de liberación versus tiempo. El porcentaje de liberación se determinó con la **Ecuación 5** (Helaly & Hashem, 2013).

$$\% \text{ liberado de AU} = \frac{Wt}{W0} \times 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

donde *Wt* cantidad de AU liberado en el tiempo *t* y *W0* cantidad de AU contenido en el hidrogel.

CAPITULO V

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Obtención de ácido ursólico

De acuerdo con lo descrito en la metodología el experimento comenzó con 50,003 g de muestra seca de hojas de flor de arena. Esta muestra fue macerada con etanol al 96 % y posteriormente filtrada y concentrado con ayuda de un rotaevaporador. Como resultado se obtuvo un peso de extracto concentrado de 6,990 g. El extracto concentrado fue desengrasado con éter de petróleo y posteriormente redisolto en etanol, la disolución resultante se refrigeró durante 24 h, lo que permitió la obtención de un precipitado, secado y pesado de 1,900 g. Para la cristalización de AU se utilizó etanol al 96 % a temperatura de 60 °C se le agregó 5 g de carbón activado con el fin de decolorar la solución, con ayuda de una bomba al vacío se la solución fue filtrada, la solución obtenida fue sometida a refrigeración durante 24 h hasta obtener cristales de ácido ursólico. Estos cristales fueron filtrados, secados y pesados, con un peso final de 0,284 g.

Con los pesos registrados en el experimento se procedió a calcular los porcentajes de rendimiento mediante el uso de la **Ecuación 6**, para lo cual se tiene:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de AU}}{\text{Masa de flor de arena}} \times 100 \quad \text{Ecuación (6)}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{284,2 \text{ mg}}{50003 \text{ mg}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = 0,568 \%$$

Se puede evidenciar que el porcentaje de rendimiento obtenido es del 0,568 %, este porcentaje es menor si lo comparamos con otros trabajos realizados como el de Ludeña *et al.* (2021) quien obtuvo un valor de 0,962 % de rendimiento. La diferencia de rendimiento están sujetas a las condiciones de extracción tales como temperatura, tiempo de maceración, agitación, etc., (Fu *et al.*, 2014). La extracción que se realizó en este trabajo fue a temperatura ambiente (≈ 17 °C), el cual podría ser el factor que influyó en el rendimiento de AU.

5.2 Determinación de pureza de ácido ursólico por HPLC

La **Figura 14** muestra el cromatograma realizado con un método de elución isocrático agua:acetonitrilo (2:8), una velocidad de flujo de 1 mL/min. y una longitud de onda de detección de 210 nm. En este cromatograma se puede observar que la principal señal, el cual resulta estar en un tiempo de retención de 11,30 min corresponde al AU y su área relativa de 97,52 % el cual es asociado a su porcentaje de pureza. Estos resultado es consistente con lo reportado previamente por Srivastava & Chaturvedi, (2010).

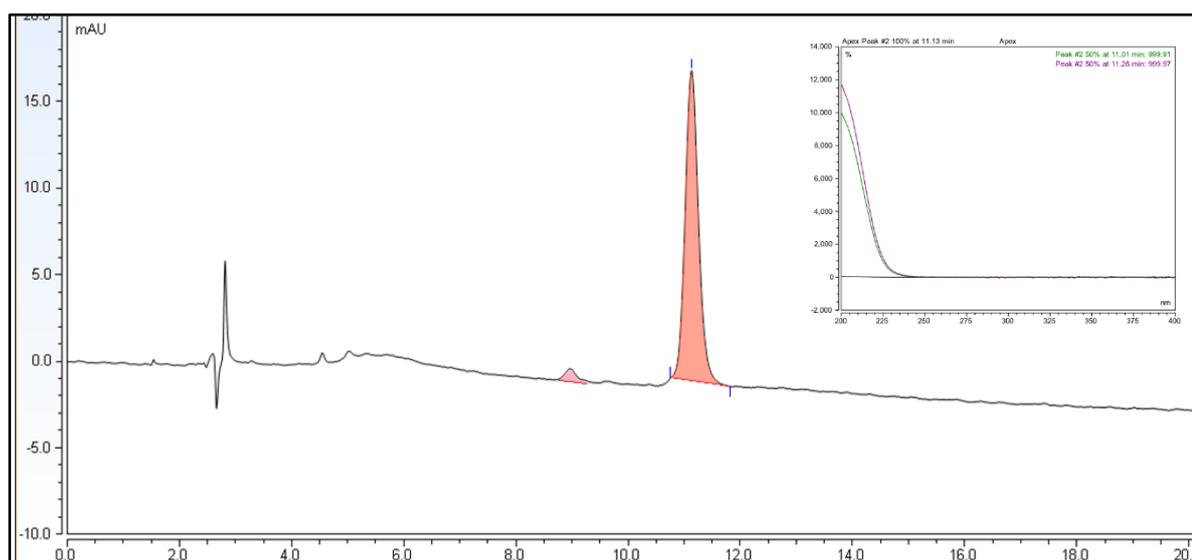


Figura 14: Cromatograma del cristal de AU

5.3 Caracterización FTIR del ácido ursólico

El espectro FTIR de los cristales de ácido ursólico obtenido (**Figura 15**) muestra las señales características pertenecientes a este compuesto en 3420 cm^{-1} el cual corresponde a la vibración de tensión del grupo hidroxilo O–H (Busuioc *et al.*, 2023). También se observan picos alrededor de 2975 cm^{-1} y 2950 cm^{-1} pertenecientes a los enlaces C–H del grupo CH_2 y al del grupo CH_3 . Así mismo, en 1714 cm^{-1} una banda de vibración de C=O del ácido carboxílico, y en 1680 cm^{-1} una banda correspondiente al doble enlace C=C, en el intervalo que va de 1450 cm^{-1} a 500 cm^{-1} se observa la huella dactilar característica del AU (Gómez-Pulido *et al.*, 2021).

La metodología empleada fue diseñada para garantizar la obtención exclusiva de ácido ursólico, siguiendo el protocolo descrito por Ludeña *et al.* (2021). Debido a esto, no se consideró necesario realizar una caracterización instrumental más exhaustiva del ácido

ursólico. El análisis HPLC que indica una pureza del 97,52 %, asegura que el producto es casi completamente ácido ursólico, adicionalmente, la caracterización mediante espectroscopia FTIR mostro picos característicos a el ácido ursólico permitiendo corroborar la presencia del ácido ursólico. Estas técnicas instrumentales nos proporcionan una validación de la identidad y pureza del ácido ursólico que justificando plenamente esta decisión.

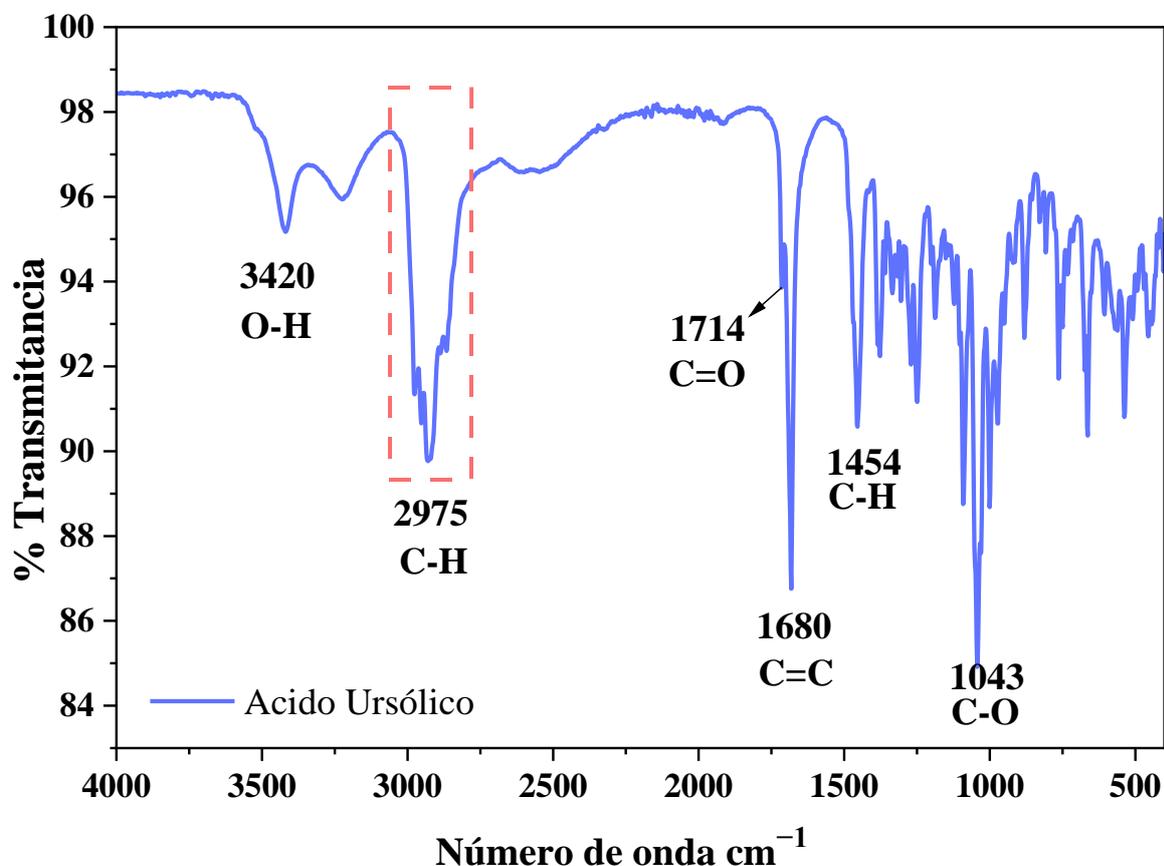


Figura 15: Espectro FTIR del ácido ursólico.

5.4 Síntesis de hidrogeles de poli(HEMA-PEG_xMEM-AI) (HG_x)

Se realizaron pruebas preliminares en el laboratorio para determinar el mejor sistema de síntesis de hidrogel que sea capaz de responder a los cambios de pH, tenga una consistencia que permita ser manipulable y sobre todo permita la carga del ácido ursólico. En este sentido, se inició haciendo uso de la metodología descrita por Tomić *et al.*, (2006), con algunas modificaciones, donde se procedió a pesar metilenbisacrilamida (MBA) como agente entrecruzante, persulfato de amonio (APS) y N,N,N,N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) como agentes iniciador y

acelerador respectivamente, esto en una solución de H₂O:EtOH (1:1). Los resultados fueron buenos, se obtuvo hidrogeles con buena consistencia como se muestra en la **Figura 16**. Sin embargo, la problemática fue que este sistema presentó dificultad de carga del ácido ursólico (cargado *in situ*), este problema se trató de solucionar al realizar la síntesis con el uso exclusivo de etanol como solvente (solubilidad del ácido ursólico en etanol 0,5 mg/mL), con el fin de mejorar la capacidad de carga del ácido ursólico (cargado *in situ*). Sin embargo, este sistema propuesto no llegó a polimerizar debido a que el APS no es soluble en etanol, es decir, no se genera los primeros radicales para que inicia la polimerización. Se evaluó otro sistema de polimerización para solucionar el problema de solubilidad del APS en etanol presentado en el anterior sistema. Para lo cual, se usó el iniciador peróxido de benzoilo (PBO) al 1 % ya que el PBO es relativamente soluble en etanol (17,9 mg/g). Sin embargo, el sistema tampoco polimerizo.

Al tener presente que el sistema descrito anteriormente no polimerizo se optó por cambiar nuevamente el iniciador y esta vez se usó un iniciador térmico el cual fue azobisisobutironitrilo (AIBN) al 1 %, la metodología de este sistema está descrito en trabajos realizados por Vargas *et al.* (2020); del Prado *et al.* (2016), al cual se le realizó algunas modificaciones, la metodología consiste en pesar los monómeros HEMA, PEGxMEM, AI conjuntamente con el agente reticulante MBA al 1 %, a esto se le añadió 5 mL de etanol, enseguida se burbujea con nitrógeno gaseoso por 10 min, y se le agrego AIBN como generador de radicales libres, la disolución resultante se introdujo en la estufa a una temperatura constante de 60 °C por 24 h. Pasado este tiempo, se observó que la polimerización fue idónea, sin embargo, el hidrogel sintetizado por este método no presentó un buen grado de hinchamiento en agua tal como se puede evidenciar en la **Figura 16**.

Por último, se propuso la síntesis del hidrogel poli(HEMA-PEGxMEM-AI) (HG_x) por fotopolimerización esta metodología cumple con el mismo principio de polimerización mediante la generación de radicales libres, este es un sistema que permite obtener los hidrogeles en una cantidad de tiempo corta, la metodología está descrita en la **sección 4.2.1** de esta tesis. El sistema propuesto si polimerizo y presentó un buen grado de hinchamiento en agua, por lo tanto, esto motivo a que la carga del ácido ursólico se podría realizar sumergiendo el hidrogel en una disolución de MetOH con ácido ursólico (carga en disolución) o cargado *in situ* al momento de la polimerización tal como se evidencia en la **Figura 16 c y d**.

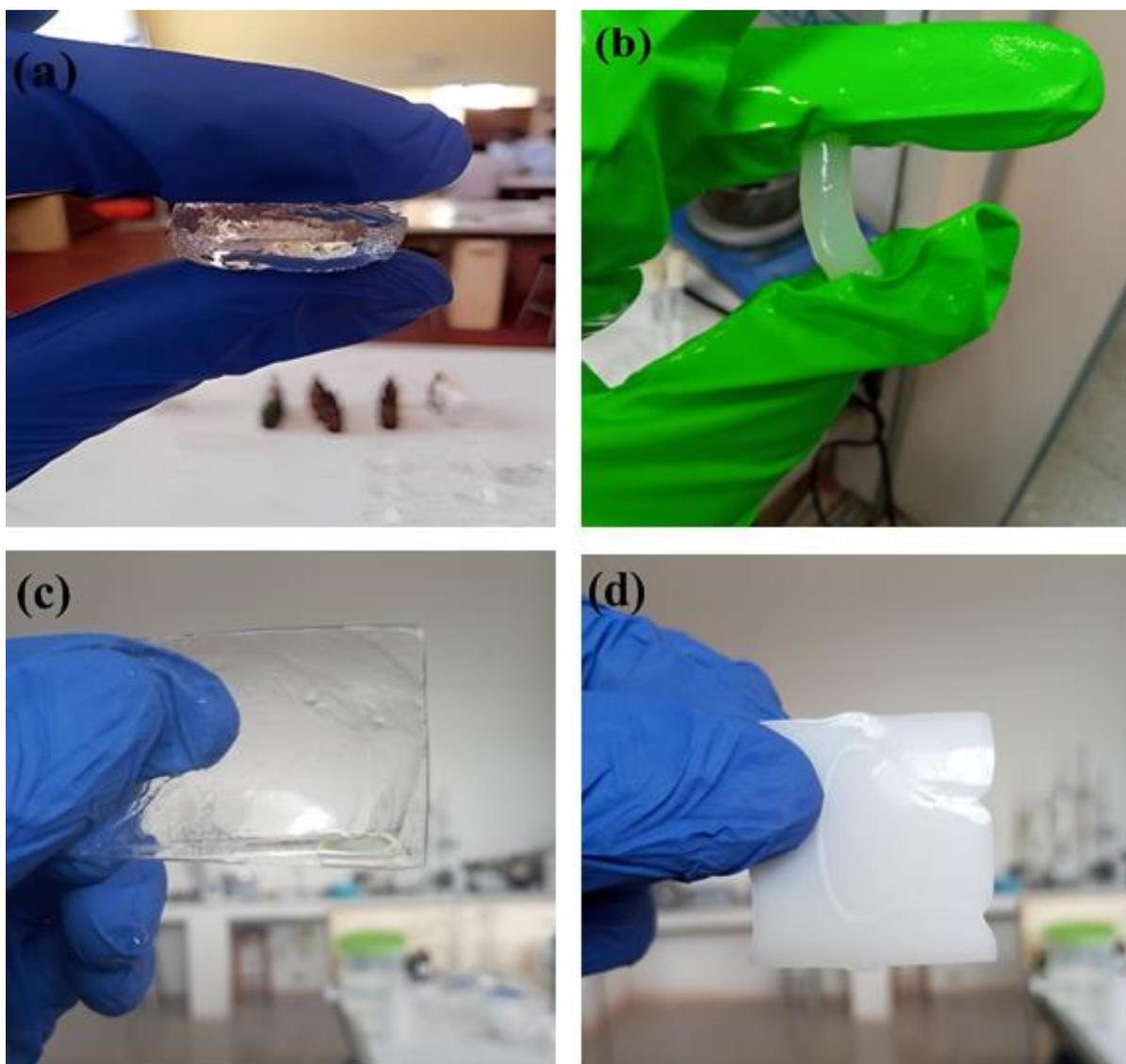


Figura 16: Hidrogeles de p(HEMA-PEGxMEM-AI), (a) con APS, (b) con AIBN, (c) por fotopolimerización sin AU y (d) por fotopolimerización con AU.

Por lo tanto, en base a estas pruebas preliminares, se establece la ruta de síntesis de hidrogeles sensibles al pH en base de los monómeros HEMA, PEGxMEM y AI, los cuales fueron sintetizados por polimerización de radical convencional, en presencia del agente reticulante N,N'-metilenbisacrilamida (MBA), esta reacción de polimerización de radicales libres fue iniciada por 1-hidroxiciclohexilfenilcetona (HCPK) y activada por fotoionización (**Figura 17**). Según Chen *et al.* (2016) la polimerización se inicia al generarse radicales libres, estos radicales se obtienen cuando la luz ultravioleta promueve la descomposición del HCPK, según se evidencia en la ruta de síntesis propuesta (**Anexo 1**), los principales radicales libres obtenidos

son los responsables de la iniciación de la polimerización vinílica, estos radicales libres reaccionan con los grupos vinilo de los monómeros de HEMA, PEGxMEM y AI, formando las cadenas poliméricas y debido a la presencia del entrecruzador MBA estas cadenas se entrecruzan formando la red polimérica 3D por la presencia de dos grupos vinilo en los extremos (**Figura 17**).

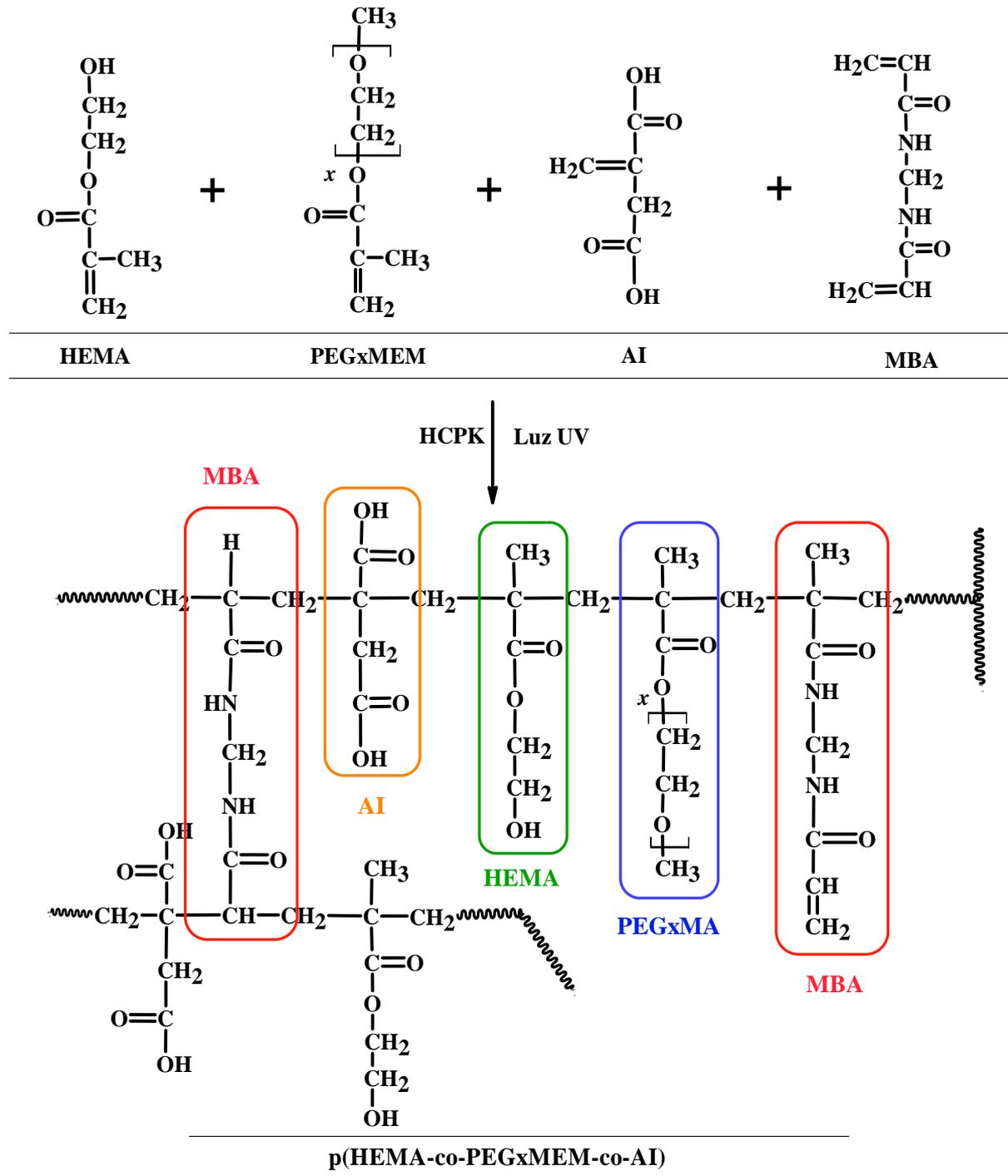


Figura 17: Reacción general de síntesis del hidrogel HG_x.

5.5 Porcentaje de rendimiento de la síntesis de HGx

El porcentaje de rendimiento de la reacción se calculó haciendo uso de la **Ecuación 1**. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 3**. Los porcentajes de rendimiento de los hidrogeles obtenidos en todos los casos son óptimos, obteniendo más del 80 % de conversión para todos los hidrogeles. En otro estudio de síntesis realizado por Oyarce *et al.* (2020) en donde realizaron la síntesis de hidrogeles de poli(HEMA-AI) mediante el método de polimerización radicalaria, obtuvo un porcentaje de rendimiento del 95,8 %. Sin embargo, Odian, (2004) en su libro publicado “Principios de la polimerización” explica que la etapa de terminación en la síntesis de hidrogeles se ve influenciada por el efecto de vitrificación el cual puede ser extremadamente pronunciado dependiendo de la temperatura de reacción, es decir, que la polimerización puede detenerse considerablemente antes de llegar a la conversión total de monómero a polímero si el sistema de reacción tiene un porcentaje de conversión cuya temperatura de transición vítrea excede la temperatura de reacción, este fenómeno es el responsable en gran medida del porque no se llegan a porcentajes muy altos de conversión de monómero-polímero.

Tabla 3: Porcentaje de rendimiento de la síntesis de hidrogeles HGx.

	HG₅	HG₉	HG₅-AU	HG₉-AU
W₀	0,932	1,098	0,947	1,119
W_t	1,165	1,319	1,178	1,332
% R	80,034	83,215	80,374	84,009

W₀: peso del gel seco, W_t: peso del total de monómeros presentes en la preparación del hidrogel, % R porcentaje de rendimiento.

5.6 Caracterización instrumental

5.6.1 Caracterización de los hidrogeles por FTIR-ATR

Para este trabajo de tesis se usó el análisis espectroscópico FTIR-ATR, para caracterizar y confirmar la polimerización de los hidrogeles. La **Figura 18** muestra los espectros correspondientes al monómero HEMA, AI, PEG₅MEM y el del HG₅. En el caso de HEMA se puede observar sus señales de vibración características a 3429 cm⁻¹ corresponde a la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo (-OH) del alcohol (Hsueh *et al.*, 2017). Las señales entre 3000 cm⁻¹ y 2800 cm⁻¹ corresponden a estiramientos alifáticos de -CH₂-, C-H y CH₃ respectivamente. También se tiene las señales a 1716 cm⁻¹ y 1634 cm⁻¹ correspondientes a la vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O) y de enlace C=C respectivamente (Oyarce *et al.*, 2020). Con relación a la huella dactilar del espectro se puede atribuir algunos picos como en 1296 cm⁻¹ correspondiente al grupo C-O-C, el espectro del monómero AI presenta la banda ancha correspondiente al hidroxilo (-OH) entre 3230 cm⁻¹ a 2750 cm⁻¹, la señal centrada aproximadamente en 2922 cm⁻¹ correspondiente al grupo C-H, en 1689 cm⁻¹ la señal característica del grupo C=O, indicativo de un ácido carboxílico insaturado conjugado (Tomić *et al.*, 2014). El espectro del monómero PEG₅MEM resalta la presencia del pico en 2873 cm⁻¹ correspondiente al CH₃, en 1689 cm⁻¹ la señal característica del grupo C=O, en 1634 cm⁻¹ el pico correspondiente a la tensión del enlace C=C y en 1100 cm⁻¹ la banda correspondiente al grupo éter C-O-C (Alejo *et al.*, 2018). Por otro lado, en el espectro del hidrogel HG₅ se observan los mismos picos característicos que en los espectros de los monómeros HEMA, PEG₅MEM y AI, a excepción de la señal de vibración del C=C en 1630 cm⁻¹, que para el caso de los espectros FTIR de los monómeros si está presente y en caso del polímero no, esto confirma la reacción de polimerización a través de estos grupos.

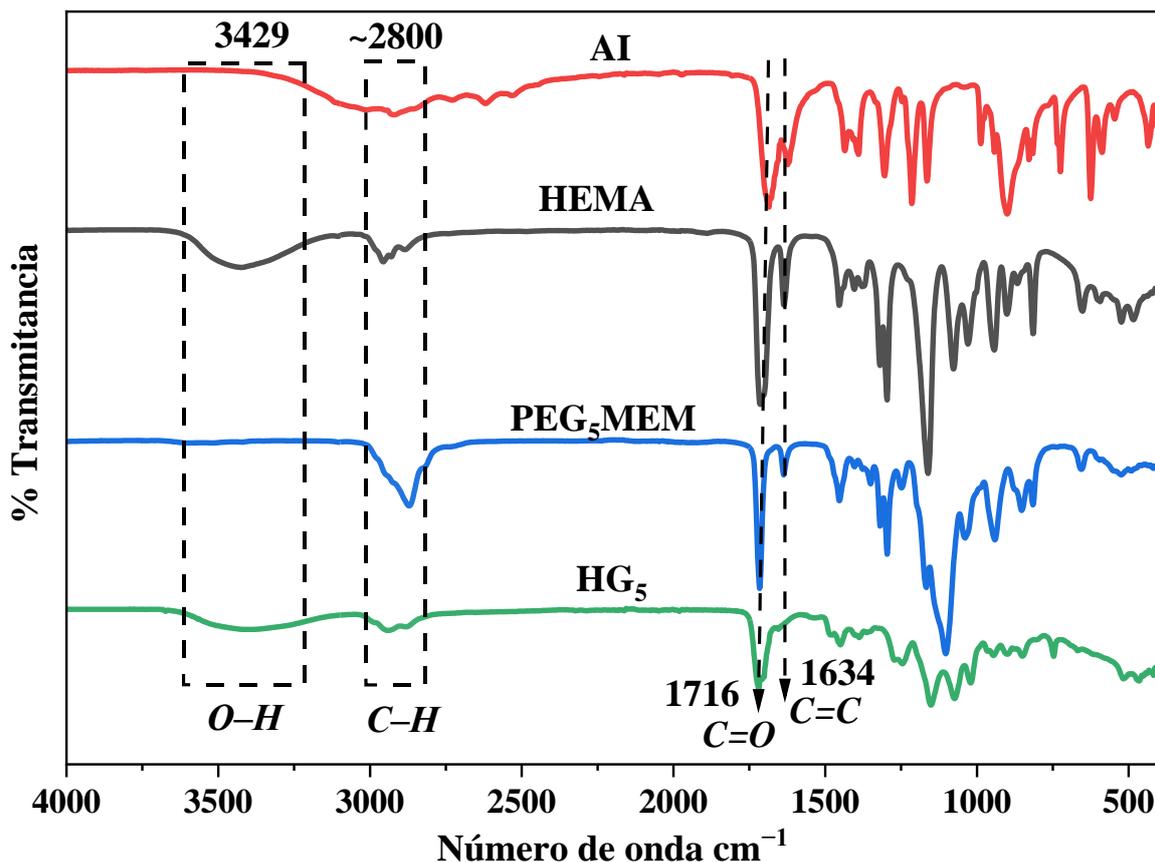


Figura 18: Espectro FTIR de los monómeros AI, HEMA, PEG₅MEM y del hidrogel HG₅.

Por otro lado, la **Figura 19** muestra los espectros FTIR de los hidrogeles sintetizados, en estos se puede destacar la presencia de los grupos -OH perteneciente al pico alrededor de 3400 cm^{-1} , los picos alrededor de 2940 cm^{-1} y 2878 cm^{-1} son los correspondientes a los grupos alifáticos -CH y -CH₂ respectivamente, la zona de 1718 cm^{-1} el pico correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O), sin embargo, la diferencia de los espectros de estos hidrogeles radica en la variación de intensidad, si nos enfocamos en la zona de 2933 cm^{-1} y 2877 cm^{-1} la cual es perteneciente a los grupos alifáticos -CH y -CH₂ se puede observar que el HG₉ presenta mayor intensidad, esto se debería a que la cadena polimérica presenta un mayor número de grupos alifáticos -CH₂ a diferencia del HG₅ o el HG_x-AU (Dabi *et al.*, 2012). De la misma forma como se expuso en el caso anterior, todos los espectros de estos hidrogeles no presentan el pico de la señal de vibración del C=C, que para el caso de los espectros de los monómeros si está presente y no en los polímeros, esto confirma la reacción de polimerización a través de los grupos C=C.

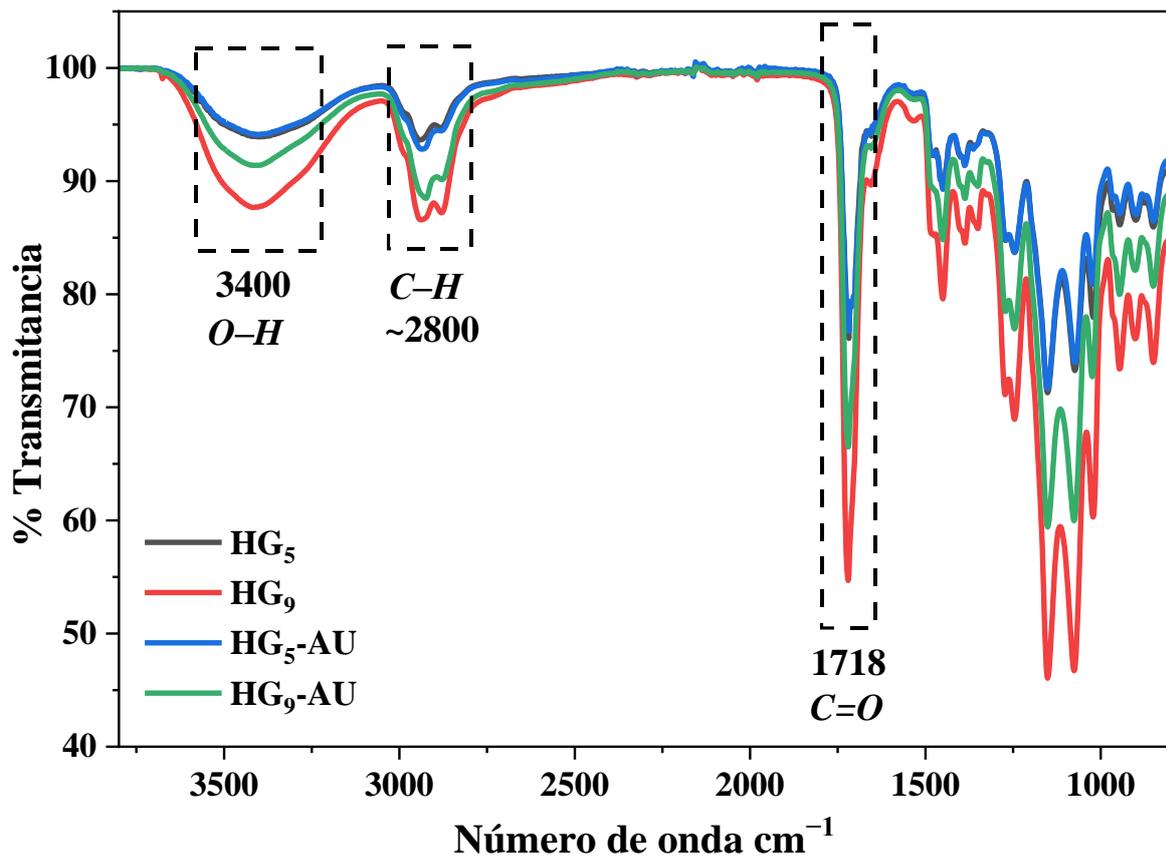


Figura 19: Espectro FTIR de los hidrogel sintetizados.

5.6.2 Caracterización de los hidrogel por espectroscopía RAMAN

El análisis espectroscópico RAMAN es una técnica espectroscópica que se usa muy a menudo como una técnica complementaria de la espectroscopía FTIR, esto ocurre gracias a las diferentes reglas de selección que gobiernan ambos procesos que determinan la actividad de modos vibracionales específicos según sea el tipo de técnica empleada, por ejemplo, el pico espectroscópico de la molécula de agua en RAMAN es significativamente menor en comparación con el espectro en FTIR, así mismo, un comportamiento similar se puede observar en la región de 1600 cm^{-1} , donde los estiramientos C=C son particularmente intensos y bien definidos en RAMAN (Miloudi *et al.*, 2017) Por lo tanto, el análisis RAMAN proporciona información más específica para los hidrogel sintetizados, según la metodología utilizada la polimerización es a través de los grupos vinilo. La **Figura 20** muestra el espectro RAMAN del hidrogel HG₅ en comparación con el espectro RAMAN del monómero PEG₅MEM, los principales picos característicos para el monómero PEG₅MEM están en la región de las bandas

de 2860 cm^{-1} correspondiente a los grupos alifáticos de CH, CH₂ y CH₃, así mismo los picos en la región de 1715 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} corresponden a los estiramientos de los grupos C=O y C=C respectivamente. Sin embargo, una diferencia importante es en la zona de 1637 cm^{-1} correspondiente al C=C que en el caso del hidrogel HG₅ no presenta esta vibración, lo cual se debe a que la polimerización se da a través de estos grupos.

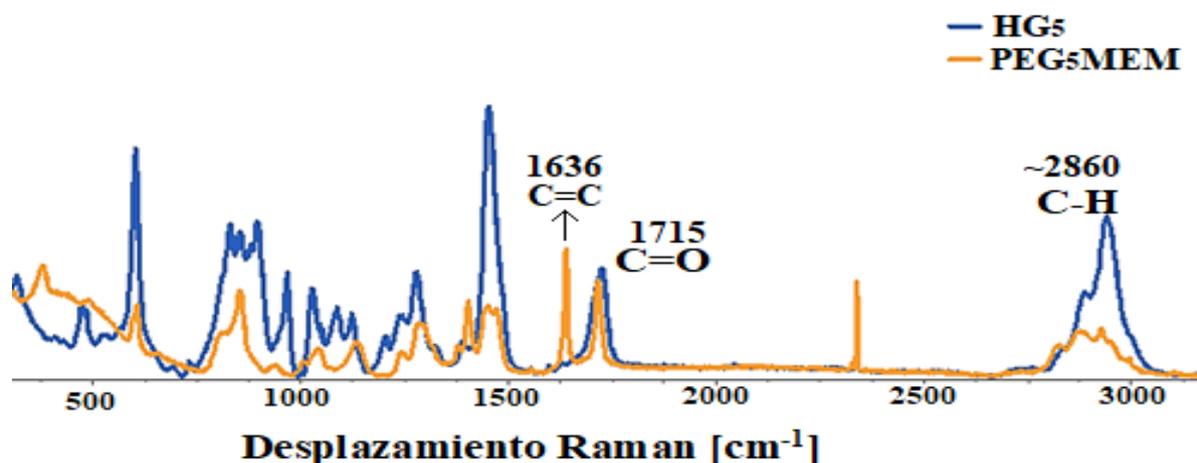


Figura 20: Espectro RAMAN del monómero PEG₅MEM y el hidrogel HG₅.

La **Figura 21** muestra la comparación entre el espectro RAMAN y FTIR del hidrogel HG₅ al hacer la comparación entre ambos espectros claramente se muestra la complementariedad, por ejemplo, los picos presentes en la zona de 3000 cm^{-1} a 2860 cm^{-1} correspondientes a grupos alifáticos de CH, CH₂ y CH₃ presentan una mayor intensidad en el espectro RAMAN que en el espectro FTIR, similar comportamiento se observa en el pico presente en 1720 cm^{-1} correspondiente al C=O donde la intensidad es mucho mayor en FTIR que en RAMAN. Sin embargo, si se enfoca en la zona de 1652 cm^{-1} del espectro FTIR se observa lo que pareciera ser un hombro del doble enlace C=C que probablemente se podría atribuir a presencia de residuos acrilatos, estos residuos podrían llegar a ser citotóxicos para las células, por lo tanto, mediante el análisis RAMAN se descarta la presencia de un pico atribuible al acrilato. Se puede concluir que se realizó una correcta síntesis a través de los grupos vinilo, así como una correcta purificación.

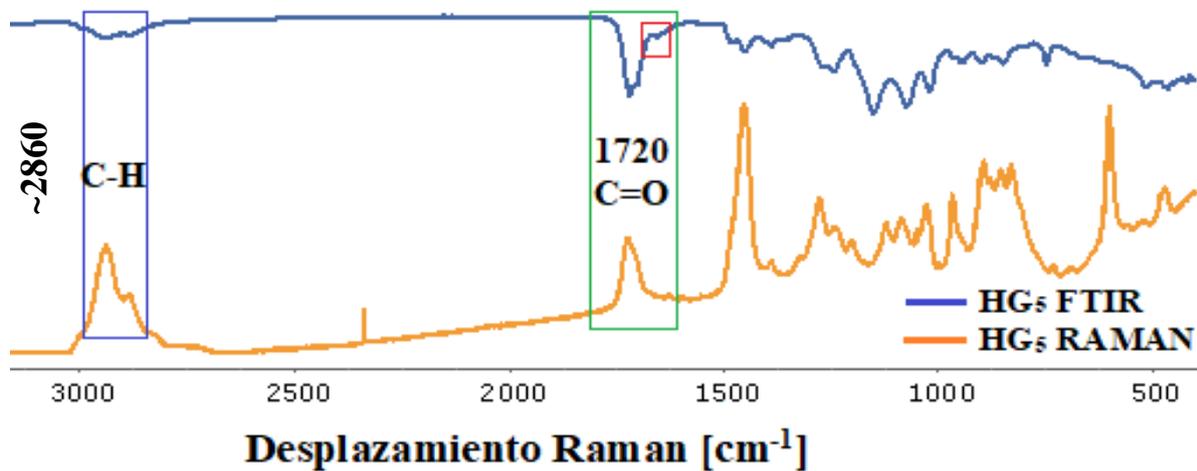


Figura 21: Espectro RAMAN y FTIR del hidrogel HG₅.

5.6.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en AU, HG₅ y HG₉, las cuales se muestran a continuación **Figura 22-24**:

La **Figura 22**, muestra la curva TGA del ácido ursólico, indicando una ligera pérdida de peso que inicia aproximadamente desde los 85 °C, esta pérdida de peso inicial podría atribuirse al etanol con el cual fue recristalizado el AU, durante este proceso los grupos hidroxilos del etanol pueden formar enlaces de puente de hidrogeno con los grupos hidroxilo del ácido ursólico, por lo que, al formarse los cristales algunas moléculas de etanol quedan atrapados en la red cristalina del AU (Ludeña Huamán, 2017). Se puede observar una disminución del porcentaje de masa que inicia a 300 °C hasta llegar a una masa remanente de 0 alrededor de los 430 °C, lo cual indica la descomposición del ácido ursólico, estos resultados son comparables con los reportados por (M. de Almeida *et al.*, 2014). Por otra parte, la curva DTG complementa esta información, mostrando picos que corresponden a las tasas máximas de pérdida de peso, el pico en 150.5 °C podría corresponder a la eliminación del etanol, pero del que se encuentra atrapado en la red cristalina del AU y no del que se encuentra en la superficie que son los que se van eliminando a los 85 °C como se mencionó previamente. El pico en 390 °C es la temperatura de velocidad máxima de degradación. Por lo cual se puede concluir que el AU es térmicamente estable por debajo de 300 °C.

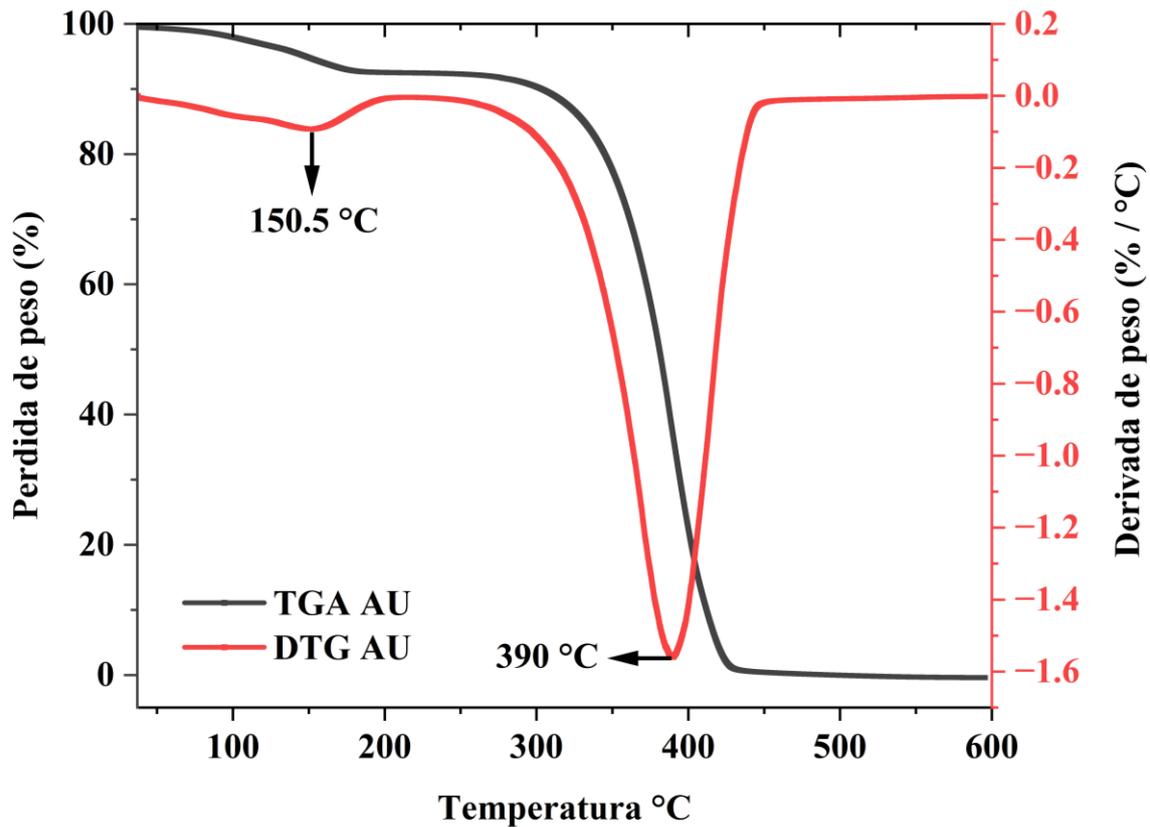


Figura 22: Termogramas TGA y DTG de AU.

La **Figura 23**, muestra la curva TGA y DTG de HG₅, en el cual se puede observar tres etapas principales de pérdida de peso. La primera etapa de pérdida de masa alrededor de los 100 °C, se podría asociar esta pérdida de masa a la eliminación de agua y monómeros que no reaccionaron (Huaman *et al.*, 2023). La segunda etapa que empieza en aproximadamente 200 °C hasta 280 °C, el cual se podría atribuir a la pérdida de agua generada en la formación de esteres a través de los grupos carboxílicos del –AI y el grupo hidroxilo de los monómeros de HEMA (Huaman *et al.*, 2024). La tercera etapa correspondiente a la degradación térmica del hidrogel, el cual inicia a 320 °C y termina a los 470 °C. La velocidad máxima de degradación ocurre a 420 °C.

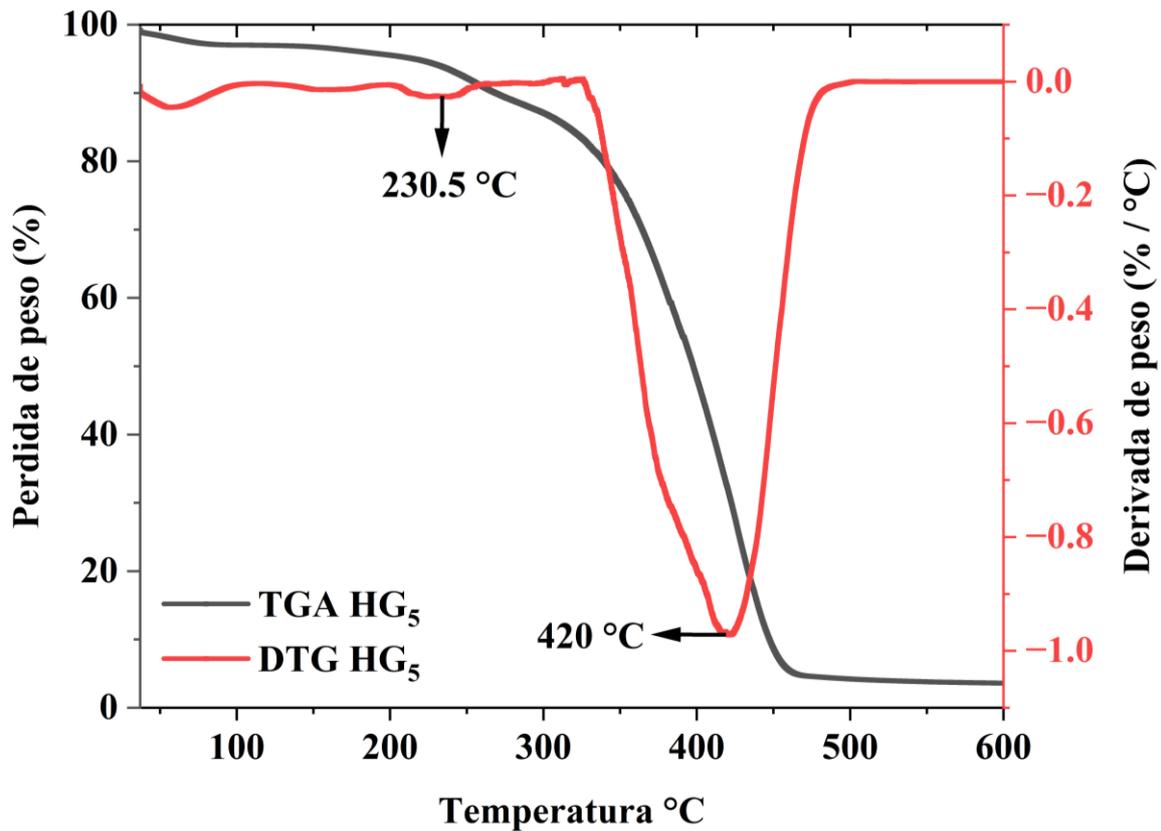


Figura 23: Termogramas TGA y DTG de hidrogel HG₅.

La **Figura 24**, muestra la curva TGA y DTG del hidrogel HG₉, revelando tres etapas de pérdida de masa al igual que el hidrogel HG₅. La primera etapa alrededor de los 100 °C, la segunda etapa que inicia a 260 °C y termina a 280 °C, con una velocidad máxima de pérdida de masa a los 255,5 °C. La tercera etapa corresponde a la degradación térmica del hidrogel, el cual inicia a 320 °C y termina a 470 °C, la velocidad máxima de degradación ocurre a 410,5 °C. Estos análisis de TGA y DTG tanto para HG₅ y HG₉ proporcionan información crítica sobre su estabilidad térmica y comportamiento de degradación, dado que los hidrogeles están destinados a ser utilizados como sistemas de suministro de AU el cual se lleva a cabo a temperatura fisiológica de 37 °C, los hidrogeles sintetizados son térmicamente estables en ese entorno.

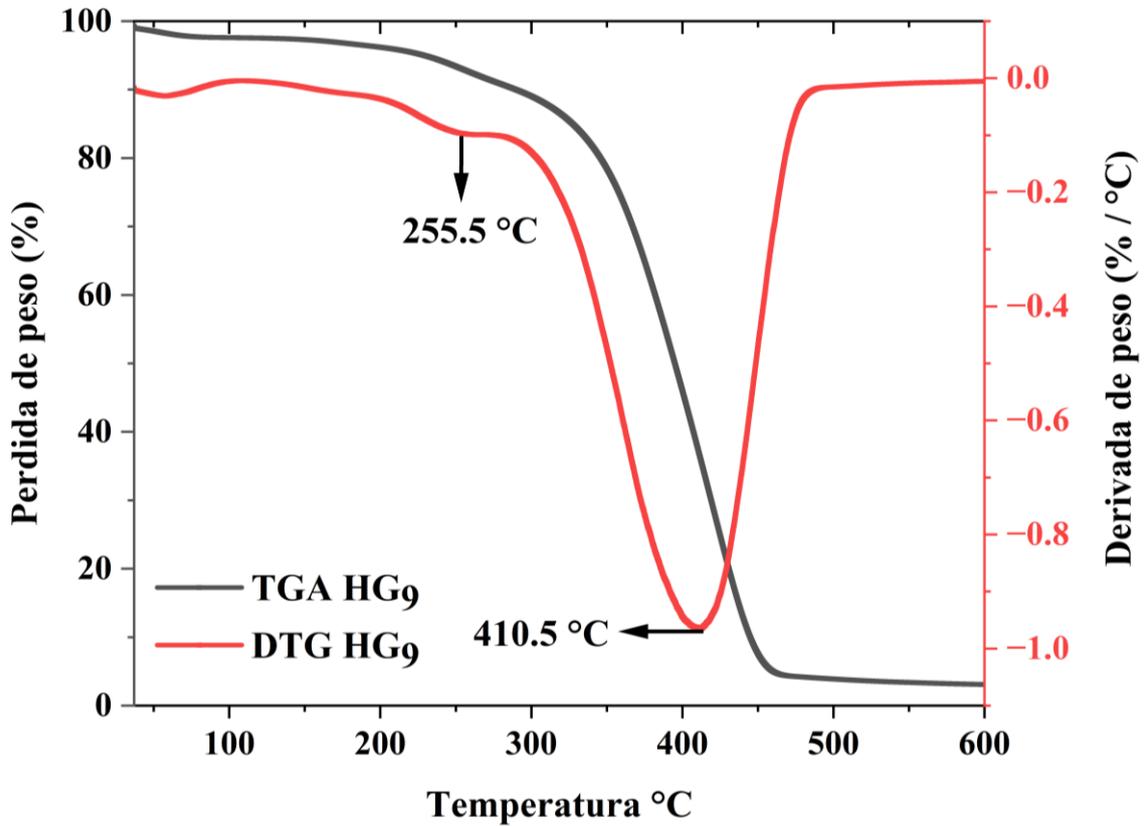


Figura 24: Termogramas TGA y DTG del hidrogel HG₉.

5.6.4 Análisis de difracción de rayos X (DRX)

Las curvas DRX de HG₅-AU y HG₉-AU, se muestran en la **Figura 25**, estos fueron comparados con la curva DRX de AU reportados por Antônio *et al.* (2017) y Qiu *et al.* (2019), estos investigadores reportaron varios picos intensos en ángulos de difracción 2θ : 10,76; 14,15; 16,49; 21,9; 26,4 y 40,22 lo que confirma el patrón cristalino del AU. Sin embargo, el DRX de HG₅-AU y HG₉-AU, mostro solo bandas anchas de 2θ : 10-25 debido a la naturaleza amorfa del hidrogel y los cuales se encuentran enmascarando a los planos cristalográficos de los cristales de AU.

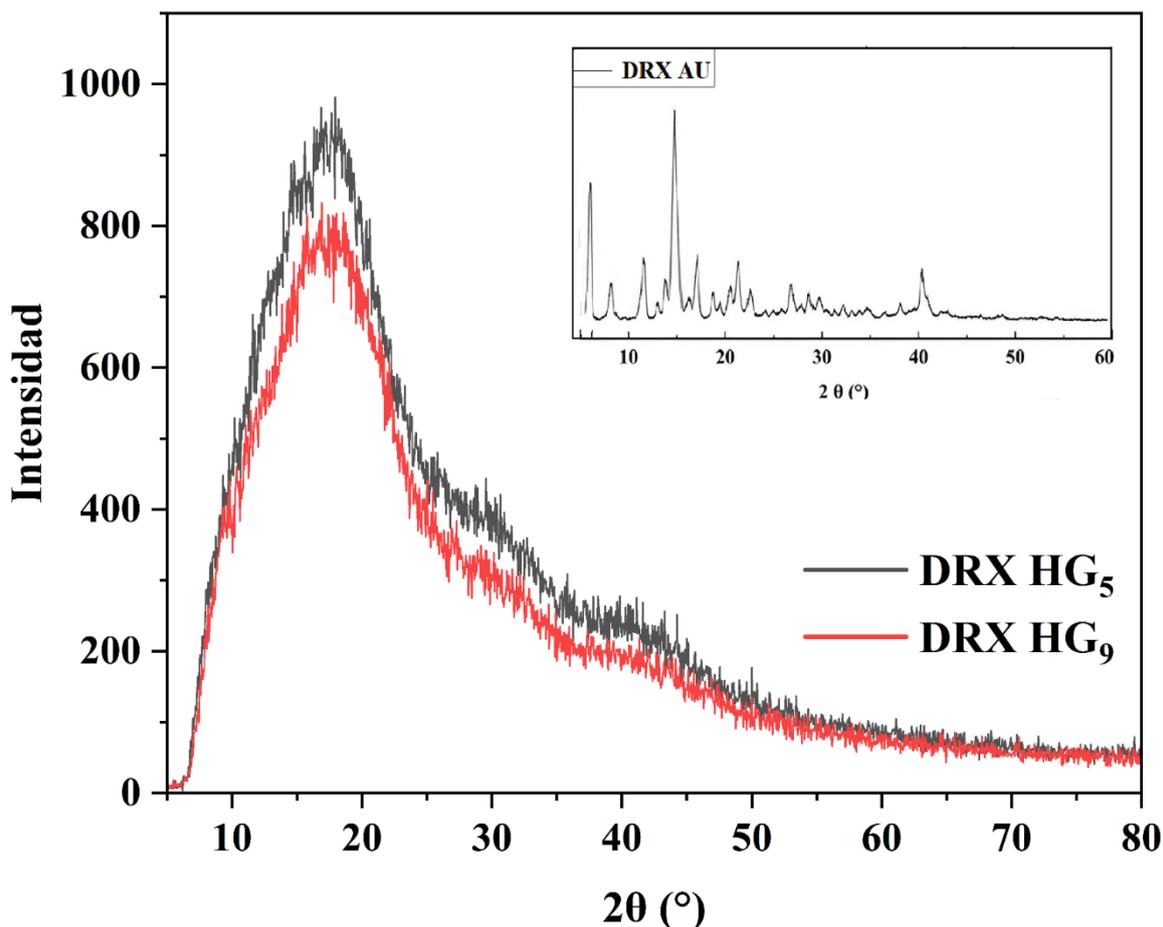


Figura 25: Espectros DRX HG₅, HG₉ y AU (reportado por Qiu *et al.* (2019)).

5.7 Caracterización fisicoquímica de los hidrogeles

5.7.1 Comportamiento de hinchamiento

Se evaluó el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles HG₅ y HG₉ en tres medios distintos, agua, etanol y metanol. El estudio de hinchamiento de los hidrogeles en agua tiene gran importancia en el campo biomédico, el grado de hinchamiento influye en las propiedades superficiales mecánicas y de movilización en el mecanismo de transporte del principio activo a través de la red polimérica (Chai *et al.*, 2017). Según la **Figura 26**, los hidrogeles de HG₅ presentan un q_{max} de 0,89 (g H₂O/g hidrogel), mientras que HG₉ presentan un q_{max} de 1,44 g H₂O/g hidrogel. El grado de hinchamiento de agua depende en gran medida de la densidad polimérica la cual puede facilitar o dificultar la formación de enlaces de hidrógeno (Huaman *et al.*, 2023), es por ello que, un mayor o menor grado de hinchamiento se debe a los enlaces

de hidrógeno inter/intramoleculares entre AI-AI ($-\text{COOH}\cdots\text{HOOC}-$) y AI-HEMA ($-\text{COOH}\cdots\text{HO}-$), los cuales podrían estar más favorecidos en cadenas poliméricas más cortas restringiendo una mayor relajación de los segmentos poliméricos y provocando una ligera disminución en la absorción del agua y en cadenas poliméricas más largas como el PEG₉MEM habría menor disposición de formar enlaces de hidrógeno inter/intramoleculares entre AI-AI ($-\text{COOH}-\text{HOOC}-$) y AI-HEMA ($-\text{COOH}\cdots\text{HO}-$) y mayor disposición de formar enlaces AI-H₂O ($-\text{COOH}\cdots\text{HO}-$) y HEMA-H₂O ($-\text{OH}\cdots\text{HO}-$) (Bajpai & Saggu, 2006; Dobić *et al.*, 2012; Huaman *et al.*, 2023).

Otro aspecto interesante por considerar es el grado de hinchamiento en solventes donde el ácido ursólico es más soluble (metanol y etanol) con el fin de evaluar el mejor medio de carga, un buen sistema de administración de fármacos debe tener una buena eficiencia de carga y encapsulación, esto se logra si el principio activo es completamente soluble en el medio en el que el hidrogel se hincha. Por este motivo, se evaluó el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles en metanol y etanol tal como lo muestra la **Figura 27 y 28**, los hidrogeles HG₅ presentaron un valor de $q_{max} = 1,65$ en etanol y $q_{max} = 1,18$ en metanol, por lo que esto nos da la posibilidad de poder realizar la carga y encapsulación del principio activo por absorción en ambos medios. Lo mismo sucede en el caso del hidrogel HG₉ que presenta un valor de $q_{max} = 1,09$ en etanol y $q_{max} = 1,24$ en metanol. Por lo cual, el mejor sistema para realizar la carga y encapsulación del ácido ursólico es en metanol ya que el AU es más soluble en este medio.

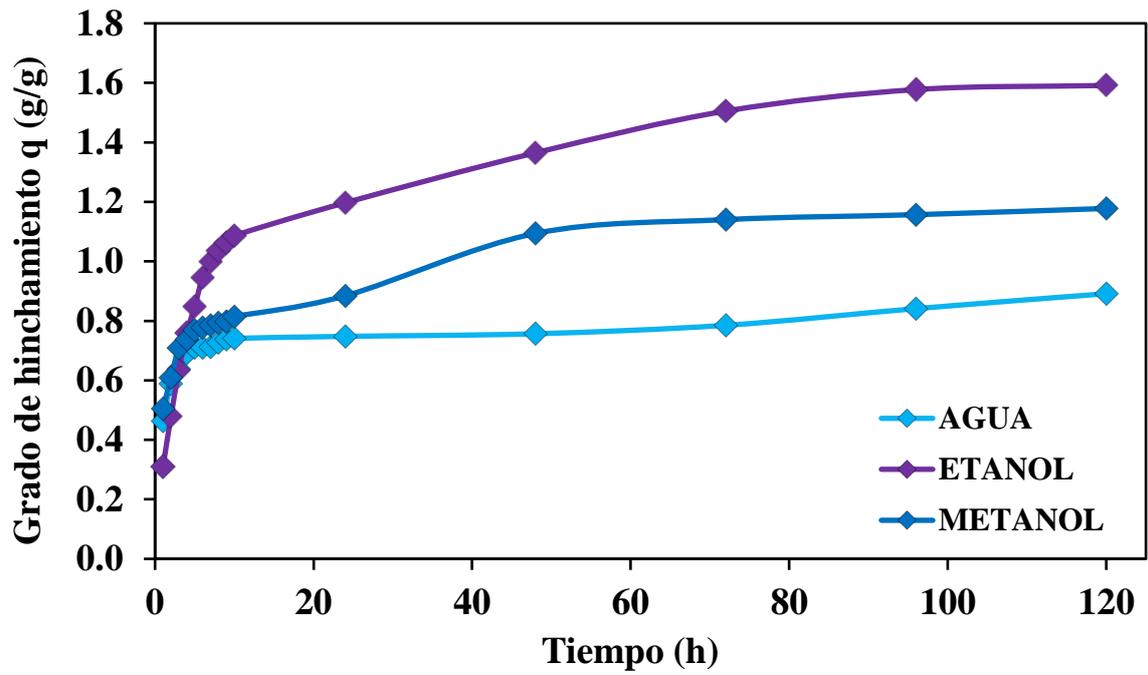


Figura 27: Comportamiento de hinchamiento de HG₅ en diferentes medios.

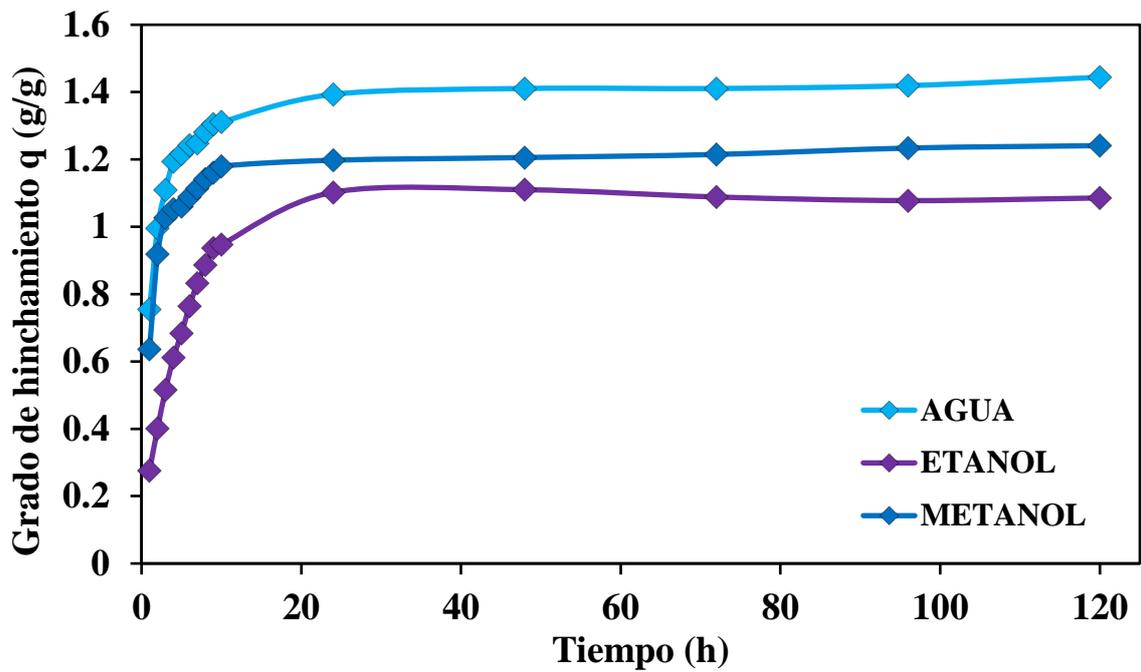


Figura 26: Comportamiento de hinchamiento de HG₉ en diferentes medios.

5.7.2 Estudio de sensibilidad al pH

El comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles en entornos de pH variables es una de las pruebas más importantes que determinan las posibles aplicaciones para administración de compuestos bioactivos. Por esta razón, se evaluó el grado de hinchamiento de los hidrogeles HG₅ y HG₉ en un rango de pH de 2 a 10 a 37 °C, tal como se puede observar en la **Figura 28**.

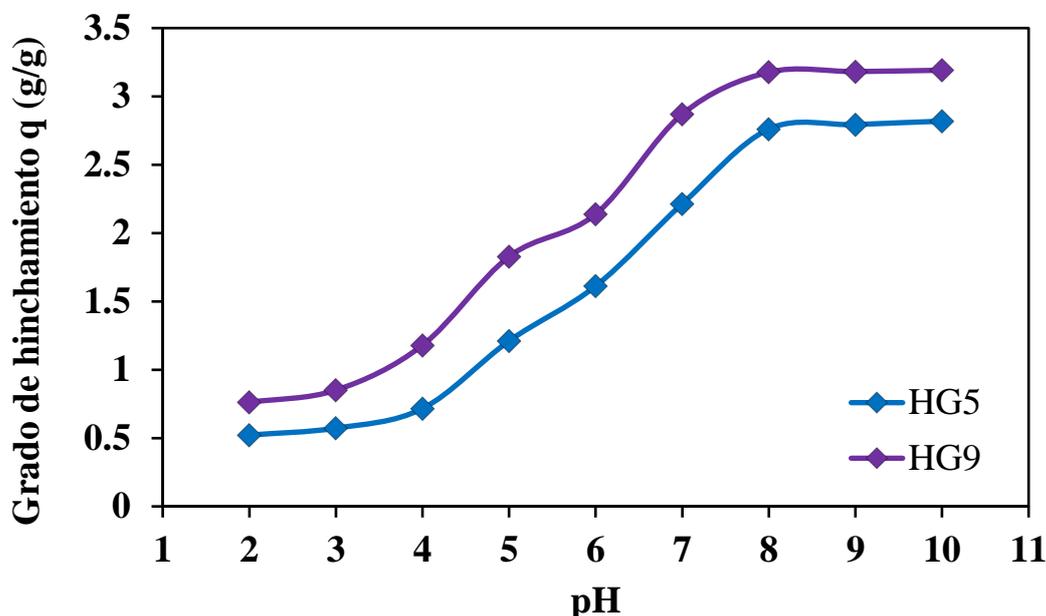


Figura 28: Comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles HG₅ y HG₉.

El grado de hinchamiento de los hidrogeles está estrechamente relacionado con los grupos ionizables presentes dentro del hidrogel, al haber mayor número de grupos carboxílicos en la red polimérica mayor será el grado de hinchamiento del hidrogel. La **Figura 28** muestra que el hidrogel HG₅ y HG₉ presentan un cambio frente a las variaciones de pH debido a la completa disociación de los grupos carboxílicos del ácido itacónico ($pK_1 = 3,85$ y $pK_2 = 5,45$) lo que le confiere al hidrogel esa capacidad de responder a los cambios de pH. A valores de pH debajo de sus constantes de disociación los grupos carboxílicos se mantienen protonados obteniendo valores bajos de q , mientras que a valores de pH por encima de las constantes de disociación los grupos carboxilo tienden a desprotonarse quedando cargados negativamente lo que provoca una repulsión electrostática, esto favorece al incremento del grado de hinchamiento obteniendo valores de q altos (Mahinroosta *et al.*, 2018), según Tomić *et al.* (2006) la capacidad de hinchamiento se ve influenciada por la longitud de las cadenas laterales colgantes, esto explica el mayor o menor grado de hinchamiento que presenta un hidrogel con respecto a otro.

Los resultados de la **Figura 28** demuestran que los hidrogeles HG₅ y HG₉ son sensibles a los cambios de pH, por lo que, se espera un comportamiento similar con los hidrogeles cargados con ácido ursólico, no obstante, para el caso de los hidrogeles HG₅-AU y HG₉-AU se evaluó el comportamiento de estos de manera cíclica en función del pH para ello se usó soluciones tampón con valores de pH de 2,2 y pH 7,4 a 37 °C y se realizó de manera cíclica, en donde cada 24 h se cambiaba al hidrogel de un pH 2,2 a un pH 7,4 a las 48 h de un pH 7,4 a un pH 2,2 y así de manera cíclica.

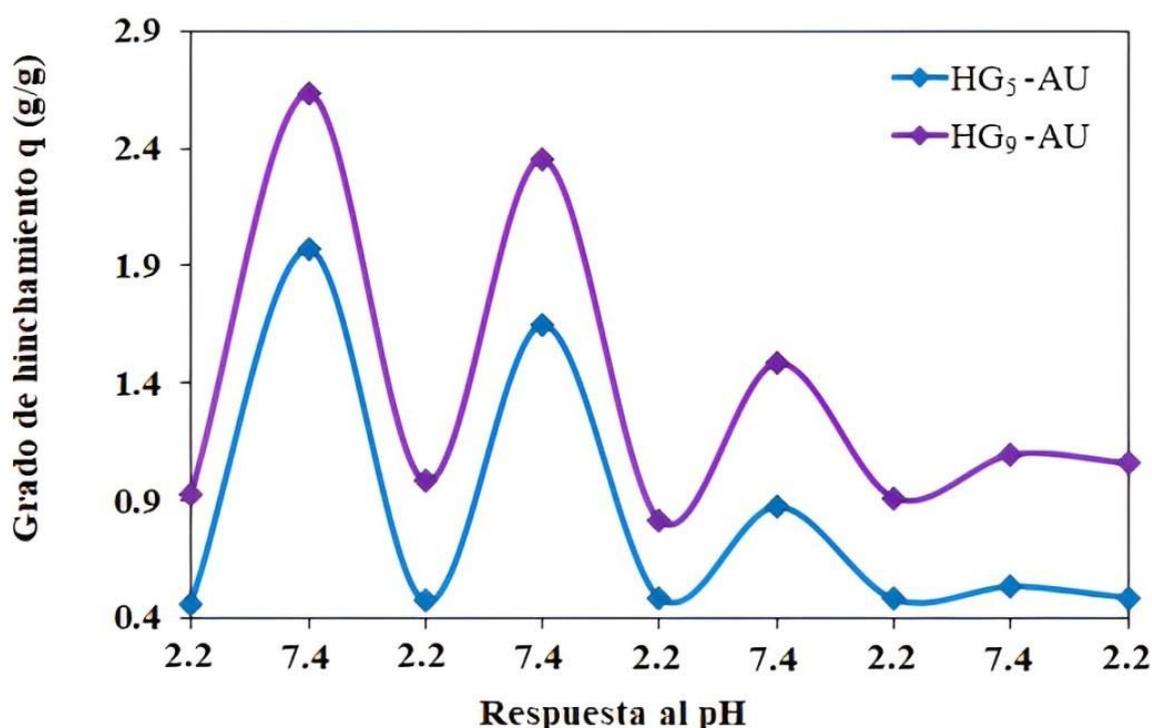


Figura 29: Grado de hinchamiento en pH 2,2 y 7,4 durante tres ciclos sucesivos.

La **Figura 29** muestra el probable comportamiento del hidrogel al ingerirse a través del sistema gastro intestinal, donde en un pH estomacal (pH 2,2) protegerán al ácido ursólico y no se liberará, mientras que al pasar a un pH intestinal (pH 7,4) estos hidrogeles hincharán y liberarán el ácido ursólico aumentando su disponibilidad. Para el caso del HG₅ en pH 2,2 alcanza un $q_{max} = 0,45$ en 24 h, en pH 7,4 alcanza un $q_{max} = 1,97$ en 24 h, mientras que, para el caso del HG₉ en pH 2,2 alcanza un $q_{max} = 0,93$ en 24 h, en pH 7,4 alcanza un $q_{max} = 2,64$ en 48 h. Se puede observar también en la **Figura 29** que ocurre una disminución de la capacidad de hinchamiento después de cada ciclo, esto se debe probablemente a la formación de algunas

asociaciones entre las cadenas que pueden atribuirse a interacciones ion-dipolo (Tomić *et al.*, 2014), si se compara estos datos con estudios similares como el realizado por Dobić *et al.* (2012) en donde realizan la síntesis de hidrogeles de p(HEMA/IA/PEGDMA) obtiene grados de hinchamiento para valores de pH 2,2 cercanos a 0,5 (g/g) y para valores de pH 7,4 valores de hinchamiento cercanos a 3 (g/g). Con lo cual, se demuestra que los hidrogeles sintetizados tienen potencial como sistemas de transporte de compuestos bioactivos.

5.7.3 Morfología de los hidrogeles por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La caracterización morfológica de los hidrogeles mediante el análisis SEM se llevó a cabo con el propósito de examinar el tamaño y la variación de los poros del hidrogel en función del pH al que están expuestos. Según Rogic Miladinovic *et al.* (2017), una mayor cantidad de poros en el hidrogel favorecerá una mayor penetración del agua a través de las redes poliméricas.

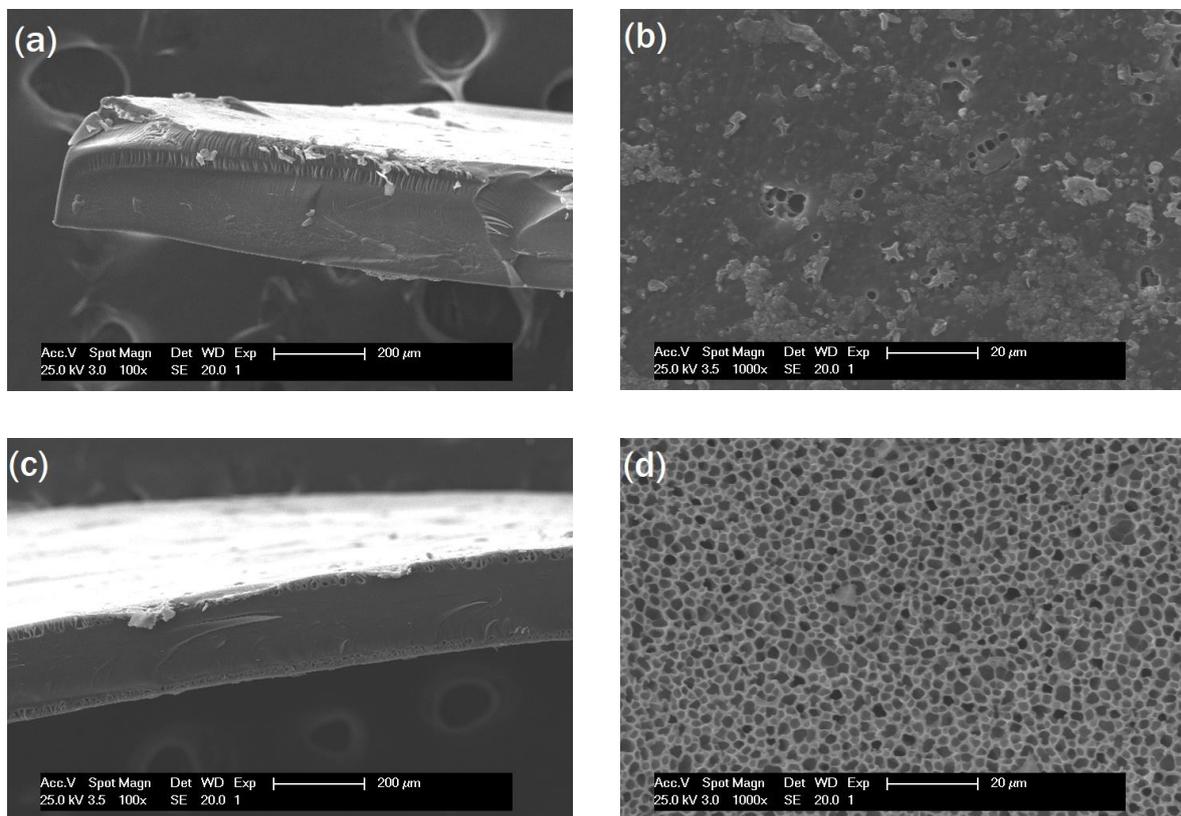


Figura 30: Estructura morfológica del hidrogel HG₅ (a), (b) en medio ácido pH 2,2 y HG₅ (c), (d) en medio básico pH 7,4.

La **Figura 30 (a) y (b)** muestra la morfología del hidrogel HG₅ en condiciones ácidas donde se observa una estructura más rígida con poros contraídos. Sin embargo, al analizar las imágenes que representan al hidrogel HG₅ expuestos a un pH 7,4 presentadas en la **Figura 30 (c) y (d)** se observa una red con poros más abiertos y distribuidos uniformemente. Esto se debe a que los hidrogeles en un entorno de pH básico los grupos carboxilo del hidrogel se desprotonan lo que resulta en una repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas, por tanto, tienden a hincharse y expandirse mostrando poros más definidos esto favorece una mejor retención del agua, carga y difusión del ácido ursólico a través de la matriz polimérica.

Por otra parte, la **Figura 31** muestra los análisis SEM del hidrogel HG₉ donde se puede observar una mayor presencia de poros plegados en la parte transversal tanto en condiciones de pH ácido como básico, también se observa poros menos uniformes y más irregulares en la superficie del hidrogel. La forma plegada en la parte transversal del hidrogel probablemente mejoro el grado de hinchamiento en agua al expandirse. Esto coincide con los valores de grado de hinchamiento obtenidos en este trabajo donde se muestra un mayor hinchamiento en agua para los hidrogeles HG₉ en comparación del hidrogel HG₅.

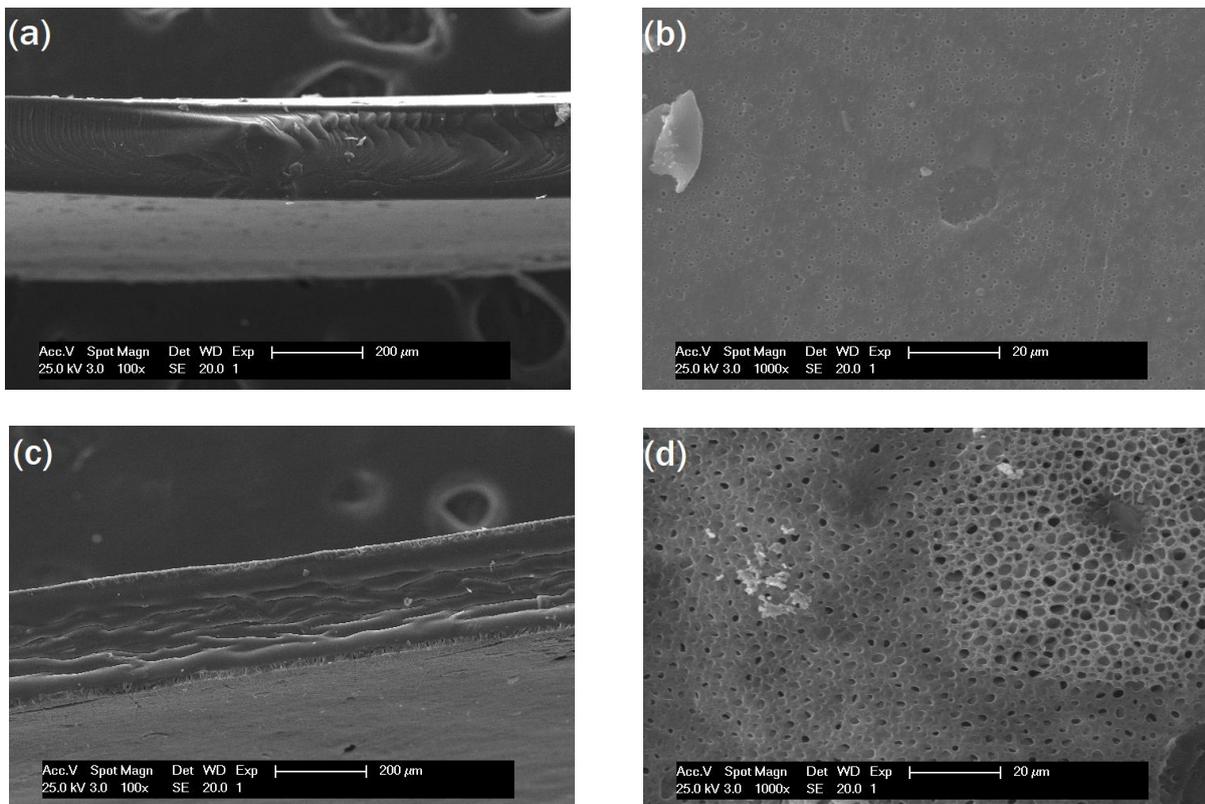


Figura 31: Estructura morfológica del hidrogel HG₉ (a), (b) en medio ácido pH 2,2 y (c), (d) hidrogeles en medio básico pH 7,4.

5.7.3.1 Determinación del tamaño de poro del hidrogel

La porosidad y el grado de hinchamiento de los hidrogeles son parámetros interrelacionados, que contribuyen directamente en aplicaciones de liberación de compuestos bioactivos. Hidrogeles con porosidad optimizada pueden retener mayores cantidades de agua, lo que mejora su biocompatibilidad así como también facilita una liberación más sostenida y controlada (Suhail *et al.*, 2022).

La **Figura 32** ilustra el hidrogel HG₅ sumergido en tampón 7,4 y posteriormente liofilizado. Las mediciones de los poros realizadas en el contorno del hidrogel revelan un valor promedio de 6,96 μm (**Figura 32 (a), (b)**) lo que podría sugerir un indicativo en profundidad de los poros. Por otro lado, en relación con los poros presentes en la superficie del hidrogel se obtiene un valor promedio de 2,15 μm (**Figura 32 (c), (d)**) lo que proporciona una idea clara de las dimensiones de los poros en la superficie del hidrogel.

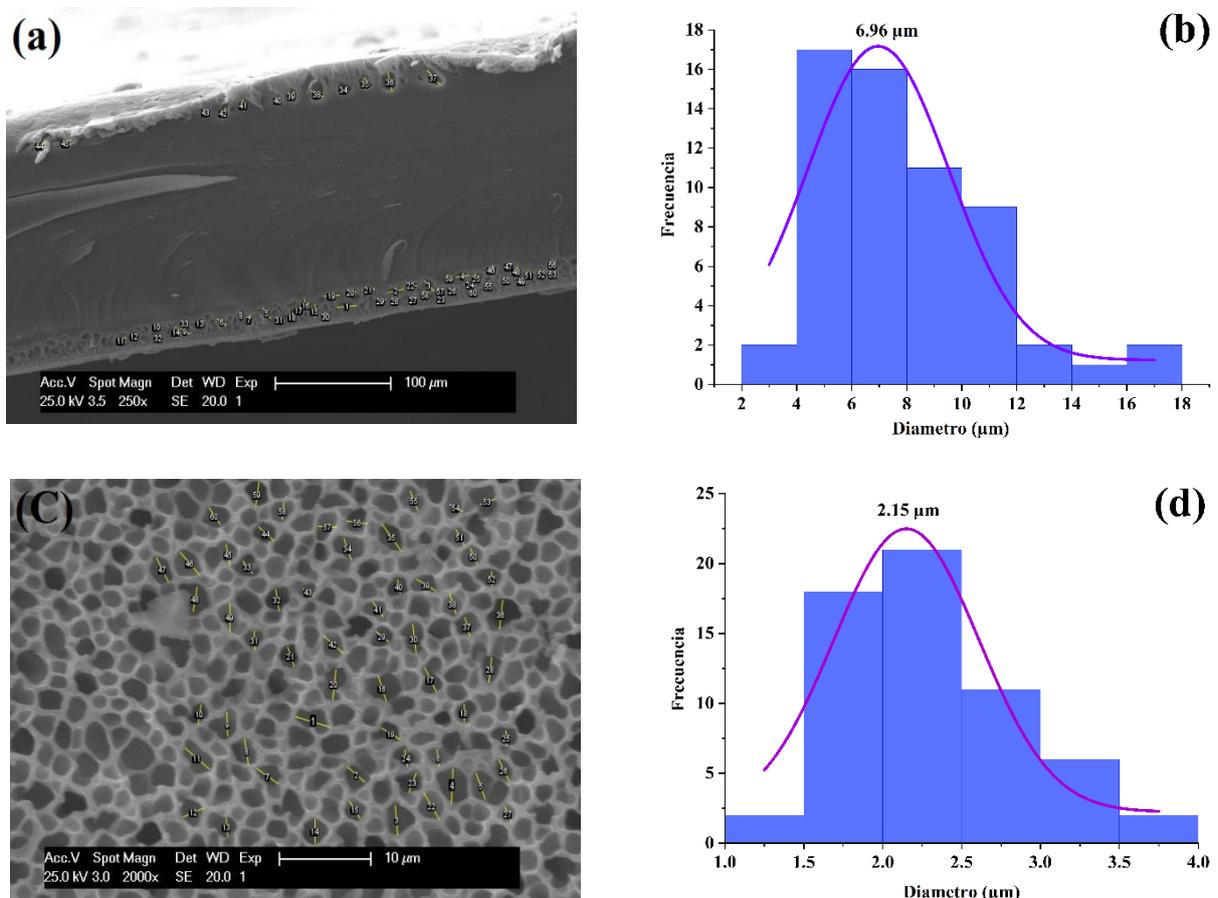


Figura 32: Micrografía de la sección transversal e histograma HG₅ (a), (b); micrografía de la superficie e histograma de HG₅ (c), (d) en pH 7,4.

Por otra parte, la **Figura 33** ilustra al hidrogel HG₉ sumergido y posteriormente liofilizado en pH 7,4. La medición del tamaño de poro en la parte transversal es de 10,14 μm (**Figura 33 (a), (b)**), también se determinó el tamaño promedio de los poros del hidrogel en la superficie dando un valor de 1,92 μm (**Figura 33 (c), (d)**), estos valores dan luces de las dimensiones del tamaño de los poros del hidrogel. Sin embargo, un detalle particular que se puede apreciar en la parte transversal del hidrogel HG₉ es la forma plegada esto desde luego facilita una mejor retención del agua e hinchamiento, así como también se observó una mayor profundidad en los poros en HG₉ a comparación de HG₅, por lo tanto, esto concuerda con los valores de hinchamiento obtenidos. Esta forma plegada y tamaño de poro no se observa en el hidrogel HG₅ bajo las mismas condiciones. Estas dimensiones son esenciales para garantizar un correcto hinchamiento, así como encapsulación y liberación controlada del ácido ursólico mejorando su eficacia terapéutica.

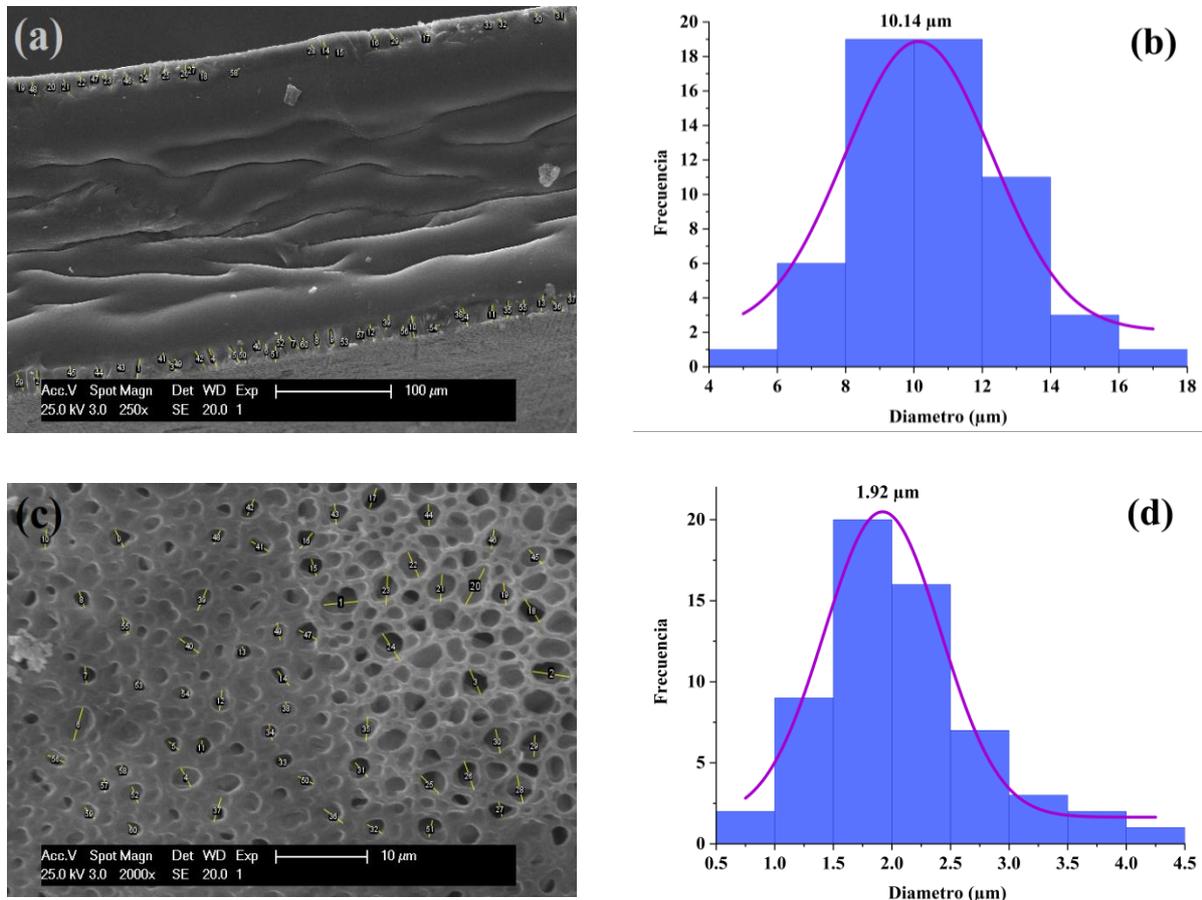


Figura 33: Micrografía de la sección transversal e histograma HG₉ (a), (b); micrografía de la superficie e histograma de HG₉ (c), (d) en pH 7,4.

Por otra parte, también se realizaron análisis morfológicos para el caso de los hidrogeles cargados con ácido ursólico *in situ* tal como se ilustra en la **Figura 34** en donde se puede observar que para ambos casos de hidrogel sintetizado si hay presencia de ácido ursólico, esto confirma una correcta y exitosa carga del ácido ursólico dentro de la red polimérica. Además, estas imágenes SEM confirman la hipótesis propuesta en este trabajo donde a valores de pH ácido los hidrogeles tenderán a estar comprimidos protegiendo de esta manera al ácido ursólico y no permitiendo su difusión (**ver Figura 34 (a) y (c)**) y a valores de pH básico estos hidrogeles tienden a hinchar y permiten la difusión del ácido ursólico (**ver Figura 34 (b) y (d)**).

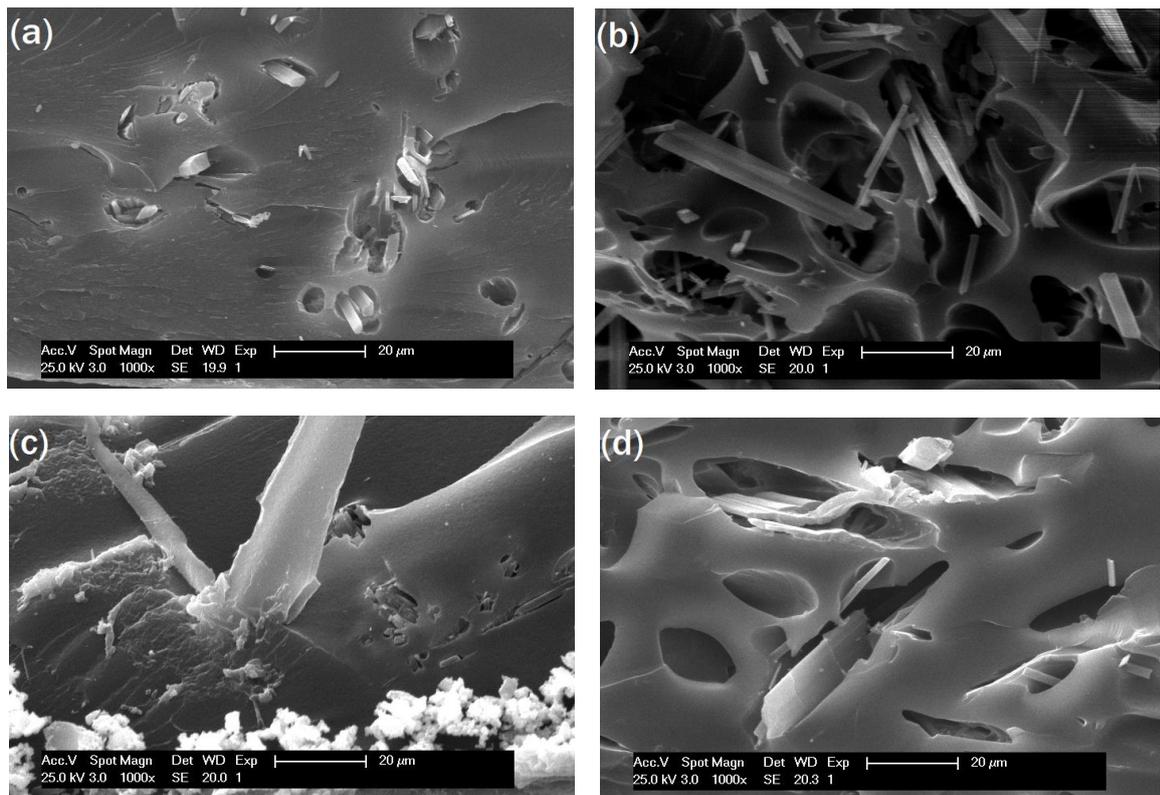


Figura 34: Hidrogeles cargados con ácido ursólico (a) HG₅ pH 2,2; (b) HG₅ pH 7,4; (c) HG₉ pH 2,2; (d) HG₉ pH 7,4

5.8 Eficiencia de carga y encapsulación

5.8.1 Curva de calibración estándar de ácido ursólico

Se preparó una solución madre de ácido ursólico (1 mg/mL) en metanol y a partir de ella se realizaron diluciones con metanol para preparar soluciones estándar en concentraciones conocidas de 5, 20, 40, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$, de estas soluciones estándar se tomaron alícuotas de 2 mL de cada solución, respectivamente, y se usaron para construir la curva de calibración estándar de ácido ursólico haciendo uso de un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 210 nm (**Figura 35**).

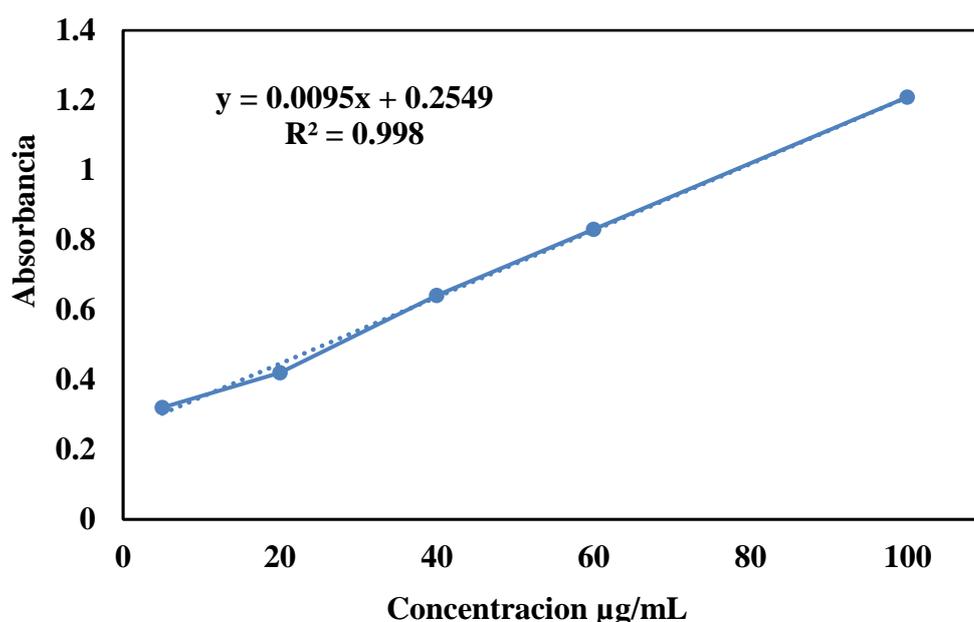


Figura 35: Modelo de curva de calibración estándar de ácido ursólico.

Como se puede observar el coeficiente de determinación (R^2) es de 0,998 cuyo valor cercano a 1 demuestra la linealidad de la calibración, por tanto, en base a esto se realizó los cálculos para determinar la EC y EE.

5.8.2 Determinación de la concentración de AU en HG_x, EC y EE

Para determinar la eficiencia de carga y encapsulación en los hidrogeles HG₅-AU y HG₉-AU, cargados por absorción e *in situ*, primero se tuvieron que secar los hidrogeles a temperatura ambiente. Luego, fueron introducidos en 5 mL de metanol durante 24 h, pasado este tiempo se

sometió a ultrasonido por una hora con el fin de liberar todo el ácido ursólico de la red polimérica. La **Tabla 4 y 5** muestra la eficiencia de carga y encapsulación de los hidrogeles HG_x cargados por absorción e *in situ* respectivamente los cuales fueron calculados con las ecuaciones 3 y 4 respectivamente.

Tabla 4: Eficiencia de carga y encapsulación de los hidrogeles HG_x cargados por absorción.

	Cantidad de AU en HG _x (mg)	Cantidad de AU inicial (mg)	Peso de HG (mg)	EC (%)	EE (%)
HG ₅ -AU	0,723	25	50	1,45	2,89
HG ₉ -AU	0,689	25	50	1,38	2,76

Tabla 5: Eficiencia de carga y encapsulación de los hidrogeles HG_x cargados *in situ*.

	Cantidad de AU en HG _x (mg)	Cantidad de AU inicial (mg)	Peso de HG (mg)	EC (%)	EE (%)
HG ₅ -AU	30,34	35,00	947	3,20	86,69
HG ₉ -AU	30,05	35,00	1119	2,69	85,86

La eficiencia de carga relaciona la cantidad de ácido ursólico que el hidrogel puede incorporar en su matriz polimérica, mientras que la eficiencia de encapsulación relaciona la proporción de ácido ursólico que se encuentra encapsulado dentro del hidrogel en comparación a la cantidad de ácido ursólico inicial. En este sentido, la **Tabla 4** muestra valores bajos de eficiencia de carga y encapsulación para la metodología de cargado de ácido ursólico por absorción. La razón, de esto se le puede atribuir a la interacción del AU con el polímero, lo cual dificulta una correcta carga por este medio. Sin embargo, la **Tabla 5** presenta una eficiencia de carga y encapsulación para el HG₅ de 3,90 y 86,69; respectivamente, y para HG₉ una eficiencia de carga y encapsulación de 2,69 y 85,86; respectivamente. Estos valores son comparables a los reportados por Das *et al.* (2017) quienes logran una eficiencia de carga de 3,35 % y eficiencia de encapsulación de 55,52 % para el caso de un portador lipídico nanoestructurado cargado con ácido ursólico recubierto con oligosacáridos de quitosano (UA-NLC), otros autores como

Antonio *et al.* (2021) lograron una eficiencia de encapsulación del 97,47 %, por otra parte, también se reportaron valores como el de Payomhom *et al.* (2024) quien obtiene una eficiencia de carga del 1,5 % y eficiencia de encapsulación del 25 %, la eficiencia de carga se atribuye a la afinidad química del ácido ursólico con los grupos funcionales del hidrogel, mientras que la eficiencia de encapsulación sugiere una incorporación efectiva de ácido ursólico dentro de la red polimérica. Sin embargo, se observó que al aumentar la cantidad de ácido ursólico se llega a la saturación del sistema y, por tanto, este no llega a gelificar (cargado *in situ*). En base a estos resultados obtenidos se tomó la decisión de trabajar con el sistema HG_x-AU (cargado *in situ*) por presentar mejor porcentaje de carga y encapsulación del ácido ursólico dentro de la red polimérica.

5.9 Ensayo *in vitro* de liberación de ácido ursólico

5.9.1 Liberación *in vitro* del hidrogel HG₅

La liberación *in vitro* de ácido ursólico se estudió en un medio de pH 2,2 y pH 7,4 que contienen TWEEN 80 (3 %), a una temperatura constante de 37 °C con el fin de simular las condiciones gastrointestinales, el ácido ursólico liberado en puntos de tiempo predeterminado se expresó como una relación porcentual de liberación (%).

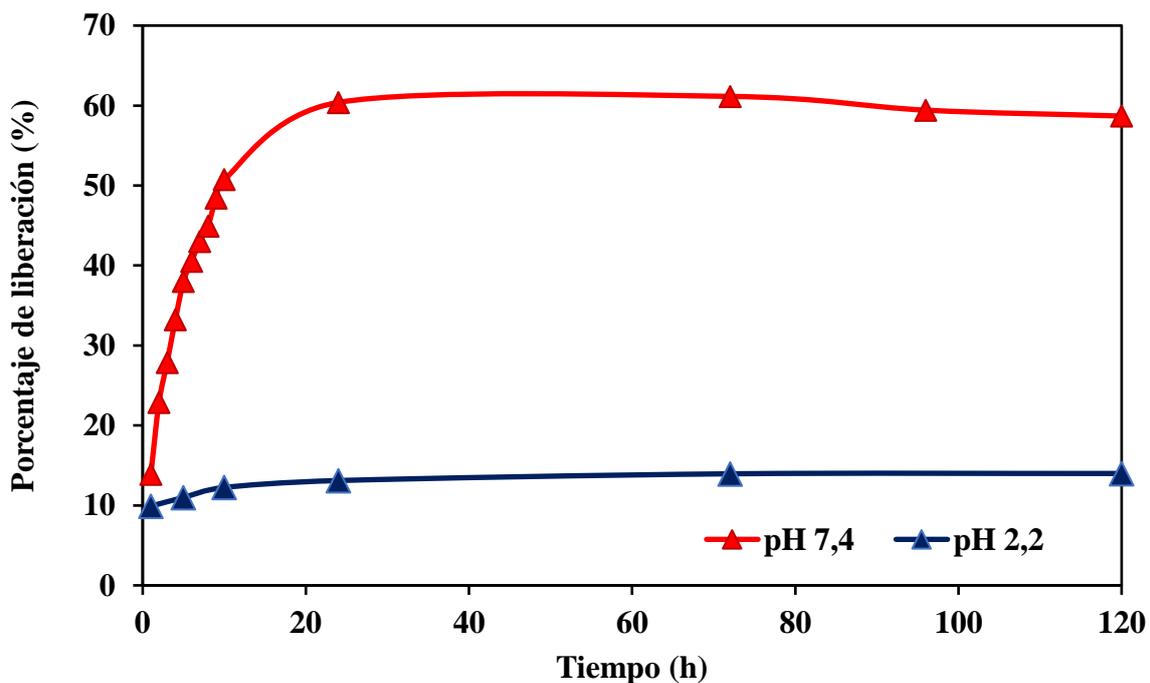


Figura 36: Liberación *in vitro* de ácido ursólico del hidrogel HG₅.

La **Figura 36** muestra el perfil de liberación del ácido ursólico desde la matriz del hidrogel HG₅, en el cual se observa una mayor tasa de liberación en pH 7,4 en comparación con pH 2,2, esto refuerza los resultados obtenidos anteriormente donde se indicó que a valores de pH ácido la red polimérica tiende a estar comprimida evitando la difusión del ácido ursólico. A pH 7,4 se puede observar una liberación inicial rápida durante las primeras 24 h alcanzando un 60,39 % seguida de una liberación sostenida hasta las 120 h.

Para comprender mejor la cinética de liberación del ácido ursólico desde la matriz del hidrogel HG₅, los datos experimentales se ajustaron a varios modelos matemáticos cinéticos: orden cero, primer orden, Korsmeyer-peppas, Hixson crowell y Higuchi (**Figura 37**). Los parámetros calculados para los modelos matemáticos se presentan en la **Tabla 6**, donde se evaluaron tres indicadores clave para determinar la calidad del ajuste. La suma de residuos cuadrados (SSR) que cuantifica el error entre los datos experimentales y los valores predichos por cada modelo, de manera que un SSR más bajo indica un menor error de predicción y por tanto un mejor ajuste del modelo. Por otro lado, el criterio de información de Akaike (AIC) equilibra la precisión del ajuste con la simplicidad del modelo, siendo más eficiente el modelo con el AIC más bajo, ya que logra un ajuste preciso sin introducir una complejidad innecesaria. Finalmente, el coeficiente de determinación (R^2) refleja que proporción de variabilidad en los datos experimentales puede explicarse por el modelo, cuanto más cercano a 1 sea el valor de R^2 mejor será el ajuste del modelo.

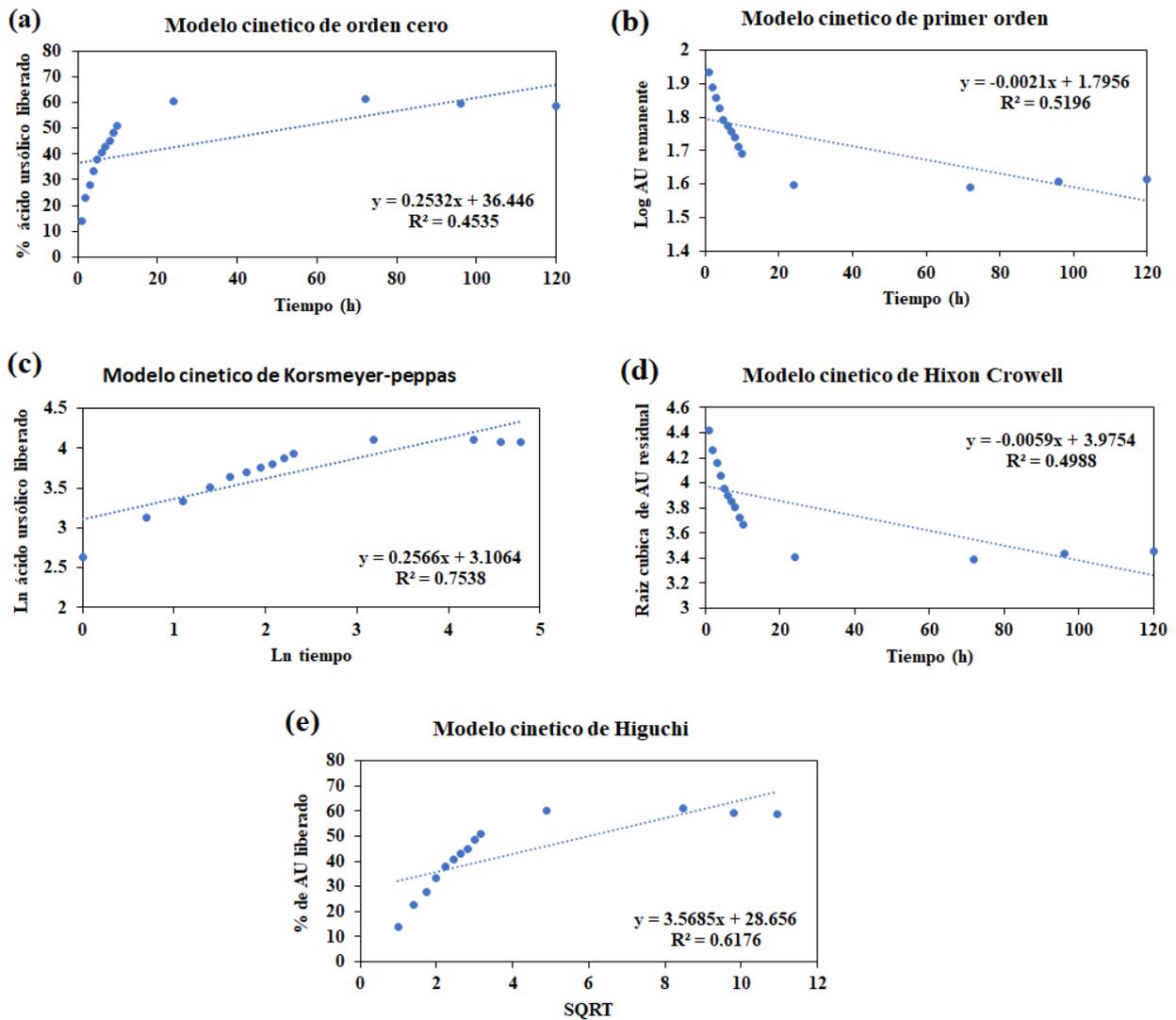


Figura 37: Regresiones lineales de modelos matemáticos cinéticos.

Tabla 6: Parámetros calculados ajustando datos de liberación utilizando varios modelos matemáticos.

HG ₅ -AU					
MODELO	C ₀	k	SSR	AIC	R ²
Orden cero	36,446	0,253	1490,330	69,348	0,454
Primer orden	6,018	0,002	0,079	-68,548	0,520
Hixson-Crowell	-	0,006	0,709	-37,755	0,499
Higuchi	-	3,569	1089,188	64,958	0,618
Korsmeyer-Peppas	-	22,340	0,582	-40,527	0,754

El modelo de Korsmeyer-Peppas mostro los valores mas bajos de SSR y AIC, adicionalmente también presente el R^2 mas cercano a 1, lo que sugiere que este modelo podría describir la liberación del ácido ursólico desde el hidrogel HG₅, aunque los modelos de orden cero y primer orden también presentaron valores de AIC negativos, su capacidad de ajuste fue significativamente inferior en comparación con Korsmeyer-Peppas, como lo demuestran sus menores valores de R^2 y mayores valores de SSR. El modelo de Korsmeyer-Peppas evalúa los mecanismos de liberación de fármacos especialmente cuando la liberación no sigue una cinética simple de orden cero o primer orden, este modelo considera tanto el hinchamiento como la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica (Altun *et al.*, 2021), esto nos da a entender que la liberación del ácido ursólico probablemente involucra un mecanismo combinado de difusión y relajación de la cadena polimérica.

El valor del exponente “n” en el modelo de Korsmeyer-peppas determina el tipo de mecanismo de difusión involucrado, Valores de $n \leq 0,45$ indican una liberación controlada predominante por difusión de Fick, valores de n cercanos a 1 sugieren un control por relajación de las cadenas poliméricas, ajustándose a un modelo cinético de orden cero, para valores intermedios de n comprendidos entre 0,45 y 1 indican un transporte anómalo, en el que tanto la difusión como la relajación influyen en la liberación, lo cual se puede estudiar empleando la difusión no Fickiana (Altun et al., 2021). En este estudio el valor de n obtenido fue de 0.2566 para HG₅ lo que sugiere una liberación por difusión de Fick (Liberación quasi-fickiana), este comportamiento se atribuye a la difusión controlada principalmente por la difusión del compuesto bioactivo a través de la matriz polimérica que se relaja e hincha en un ambiente básico (pH 7.4) (Alinavaz et al., 2021).

5.9.2 Liberación *in vitro* del hidrogel HG₉

Del mismo modo que el caso anterior, se estudió la liberación del ácido ursólico a partir del hidrogel HG₉ en condiciones de pH 2,2 y pH 7,4 a temperatura constante de 37 °C, con el fin de simular las condiciones gastrointestinales. La liberación del ácido ursólico en puntos de tiempo predeterminado se expresó como una relación porcentual de liberación (%).

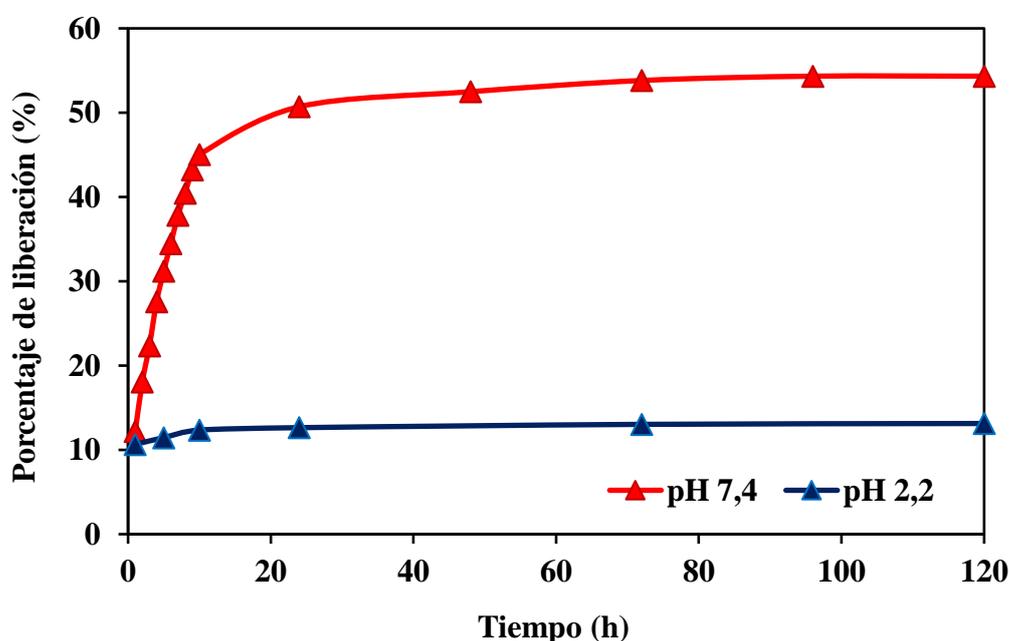


Figura 38: Liberación *in vitro* de ácido ursólico del hidrogel HG₉.

La **Figura 38** muestra el perfil de liberación del ácido ursólico en condiciones de pH 2,2 y 7,4. Se observa un porcentaje muy bajo de liberación a pH 2,2 en comparación con el pH 7,4 el cual tiene una mayor y mejor porcentaje de liberación. Este comportamiento está relacionado con la propiedad de los hidrogeles HG₉ de hinchar dependiendo del medio en el que estén expuesto. A pH 7,4 se puede observar una liberación inicial rápida del ácido ursólico durante las primeras 24 h, este fenómeno puede atribuirse a la rápida difusión de las moléculas de ácido ursólico desde los poros superficiales y las capas más externas del hidrogel, posteriormente la liberación seguida se vuelve sostenida hasta las 120 h lo que sugiere la liberación del ácido ursólico atrapado en las capas internas del hidrogel HG₉.

Para comprender mejor la cinética de liberación del ácido ursólico desde la matriz del hidrogel HG₉, los datos experimentales se ajustaron a varios modelos matemáticos cinéticos: orden cero, primer orden, Korsmeyer-peppas, Hixson crowell y Higuchi (**Figura 39**). Los parámetros calculados para los modelos matemáticos se presentan en la **Tabla 7**, donde se evaluaron tres indicadores clave para determinar la calidad del ajuste: SSR, AIC y R².

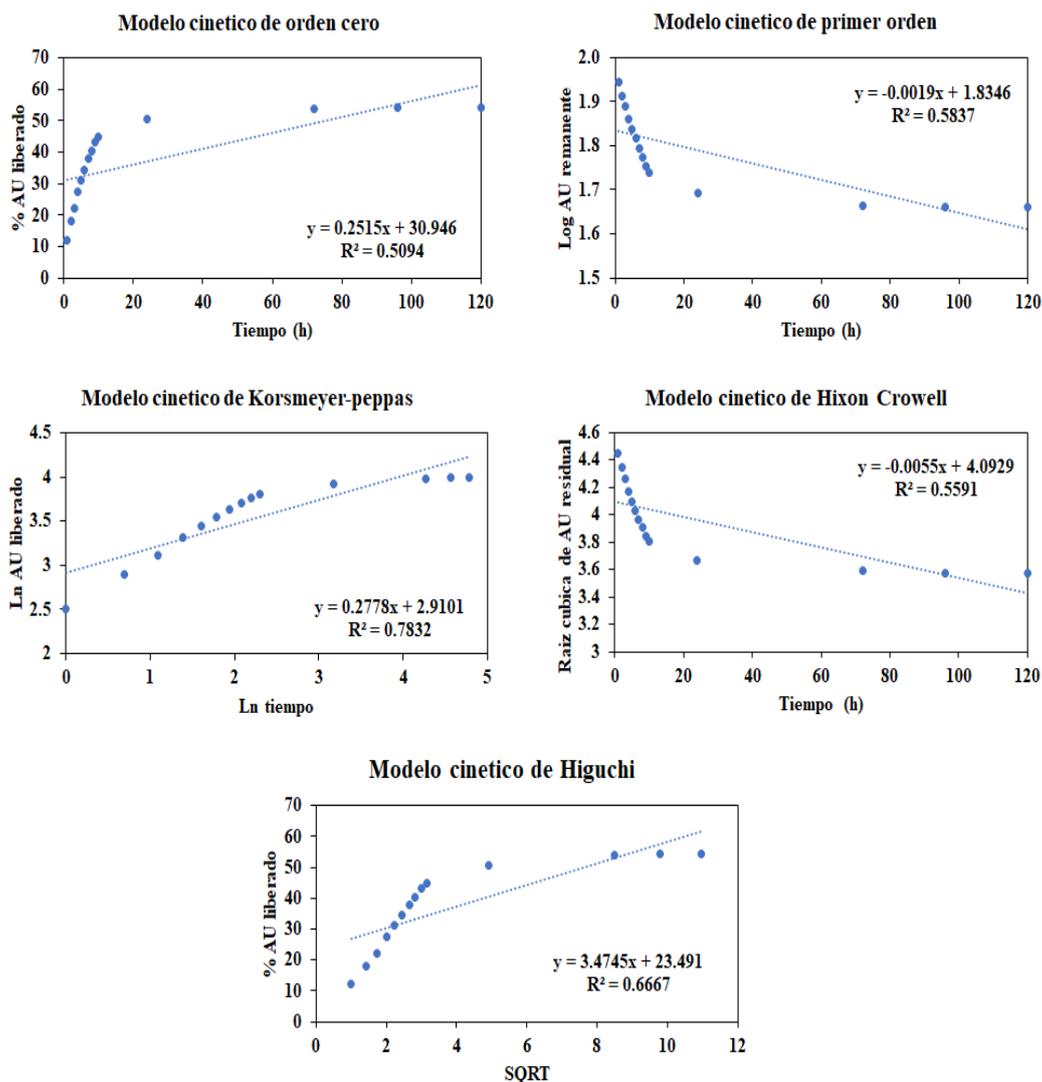


Figura 39: Regresiones lineales de modelos matemáticos cinéticos.

Tabla 7: Parámetros calculados ajustando datos de liberación utilizando varios modelos matemáticos.

HG9-AU					
MODELO	C ₀	k	SSR	AIC	R ²
Orden cero	30,946	0,252	1226,977	66,626	0,509
Primer orden	6,263	0,002	0,050	-74,927	0,584
Hixson-Crowell	-	0,006	0,487	-43,018	0,559
Higuchi	-	3,475	833,657	61,215	0,667
Korsmeyer-Peppas	-	18,359	0,578	-40,619	0,783

El modelo de Korsmeyer-Peppas mostro el mejor ajuste para describir la liberación del ácido ursólico desde el hidrogel HG₉ con valores de SSR, AIC bajos y un R² cercano a 1, lo que indica que este modelo es el más adecuado, este modelo evalúa los mecanismos de liberación de fármacos especialmente cuando la liberación no sigue una cinética simple de orden cero o primer orden, este modelo considera tanto el hinchamiento como la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica, esto nos da a entender que la liberación del ácido ursólico involucra un mecanismo combinado de difusión por relajación de la cadena polimérica, otro valor a tener en cuenta es el del exponente n, que proporciona información adicional sobre el mecanismo de liberación del principio activo, en este caso el valor de $n = 0,2778$ sugiere una liberación por difusión de Fick (Liberación quasi-fickiana), en este tipo de liberación el proceso está controlado predominantemente por la difusión del principio bioactivo a través de la matriz polimérica, lo que refuerza que la difusión del ácido ursólico se da en un ambiente básico (pH 7,4) que es donde la matriz polimérica se encuentra más relajada e hinchada facilitando su difusión (Alinavaz *et al.*, 2021).

6. CONCLUSIONES

El AU fue exitosamente extraído de la especie *Clinopodium revolutum*, purificado mediante cristalización y el rendimiento obtenido fue de 0,568 %. Los grupos funcionales característicos del AU se pudo identificar por FTIR, la cuales son las señales a 3420 cm^{-1} (O–H), 1714 cm^{-1} (C=O) del ácido carboxílico, y en 1680 cm^{-1} del enlace C=C. La pureza del AU determinado por HPLC fue de 97,52 %, estos resultados respaldan la eficacia del método empleado.

Los hidrogeles HGx se sintetizaron con éxito a través de reacciones de polimerización radical de grupos metacrilato iniciadas por fotopolimerización, los resultados mostraron un rendimiento de reacción superior al 80 % y con propiedades esperadas de hinchamiento en agua, etanol y metanol. Los hidrogeles también mostraron respuesta al cambio de pH.

Debido a los grupos carboxílicos del AI los hidrogeles tiene la capacidad de comprimirse a pH 2,2 e hinchar cuando el pH pasa a ser de 7,4. Estos resultados muestran el potencial de los hidrogeles para ser usados como sistemas de liberación de compuestos bioactivos.

La caracterización de los hidrogeles por espectroscopia FTIR y RAMAN como técnicas complementarias proporcionaron información relevante sobre su estructura química, la espectroscopia FTIR revelo la presencia de grupos –OH en 3400 cm^{-1} , grupos alifáticos –CH y –CH₂ en 2940 cm^{-1} y 2878 cm^{-1} y el espectro RAMAN confirmo la formación del hidrogel a través de los grupos vinilo C=C en 1630 cm^{-1} .

La microscopia electrónica de barrido mostró que la porosidad del hidrogel es dependiente del pH, es decir, que a pH ácidos los poros se encuentran comprimidos y a pH básico los poros se encuentran abiertos. Del mismo modo, reveló que el AU se encuentra en los poros de los hidrogeles.

La evaluación de carga y liberación del ácido ursólico (AU) en condiciones que simulan el sistema gastrointestinal demostró que los hidrogeles protegen el AU del ambiente ácido del estómago y lo liberan en el ambiente básico del intestino. Los resultados se ajustaron al modelo de Korsmeyer y Peppas, indicando un mecanismo de liberación controlada por difusión, lo que mejora la biodisponibilidad del AU. Además, HG₅ mostró una mayor eficiencia de carga (EC) y eficiencia de encapsulación (EE), lo que sugiere que puede liberar más ácido ursólico en el intestino delgado.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Investigar las propiedades mecánicas de los hidrogeles poli(HEMA-PEGxMEM-AI).
- Realizar estudios de citotoxicidad y biocompatibilidad en sistemas *in vitro*.
- Evaluar la biodegradabilidad de los hidrogeles.
- Explorar las propiedades de los hidrogeles preparados con diferentes cantidades de AI y de entrecruzador.
- Realizar la liberación en otro sistema que simule las condiciones gastrointestinales.
- Realizar la optimización utilizando métodos como de superficie de respuesta.
- Evaluar la eficacia de HGx-AU *in vitro* en modelos celulares o animales bajo condiciones estrictamente controladas, de esta manera lograr comprender de mejor manera el potencial terapéutico del ácido ursólico en el tratamiento de enfermedades específicas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alejo, T., Prieto, M., García-Juan, H., Andreu, V., Mendoza, G., Sebastián, V., & Arruebo, M. (2018). A facile method for the controlled polymerization of biocompatible and thermoresponsive oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate copolymers. *Polymer Journal*, *50*(2), 203-211. <https://doi.org/10.1038/s41428-017-0004-8>
- Almawash, S., Osman, S. K., Mustafa, G., & El Hamd, M. A. (2022). Current and Future Prospective of Injectable Hydrogels—Design Challenges and Limitations. *Pharmaceuticals*, *15*(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/ph15030371>
- Altun, E., Yuca, E., Ekren, N., Kalaskar, D. M., Ficai, D., Dolete, G., Ficai, A., & Gunduz, O. (2021). Kinetic Release Studies of Antibiotic Patches for Local Transdermal Delivery. *Pharmaceutics*, *13*(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050613>
- Antônio, E., Antunes, O. dos R., de Araújo, I. S., Khalil, N. M., & Mainardes, R. M. (2017). Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, *71*, 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.080>
- Antonio, E., dos Reis Antunes Junior, O., Marcano, R. G. D. J. V., Diedrich, C., da Silva Santos, J., Machado, C. S., Khalil, N. M., & Mainardes, R. M. (2021). Chitosan modified poly (lactic acid) nanoparticles increased the ursolic acid oral bioavailability. *International Journal of Biological Macromolecules*, *172*, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.041>
- Ausili, A., Sánchez, M., & Gómez-Fernández, J. C. (2015). Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, *4*(2), 159-170. <https://doi.org/10.3233/BSI-150104>
- Bacanlı, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2018). Chapter 3 - A Triterpenoid Commonly Found in Human Diet: Ursolic Acid. En R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Second Edition)* (pp. 31-36). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813008-7.00003-5>
- Bahram, M., Mohseni, N., Moghtader, M., Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. En *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64301>
- Bajpai, S. K., & Saggi, S. S. (2006). Water Uptake Behavior of Poly(methacrylamide-co-N-vinyl-2-pyrrolidone-co-itaconic acid) as pH-Sensitive Hydrogels: Part I. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, *43*(8), 1135-1150. <https://doi.org/10.1080/10601320600735116>
- Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*, *12*(11), Art. 11. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>

- Bercea, M. (2022). Bioinspired Hydrogels as Platforms for Life-Science Applications: Challenges and Opportunities. *Polymers*, *14*(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/polym14122365>
- Busuioc, A. C., Costea, G. V., Botezatu, A. V. D., Furdui, B., & Dinica, R. M. (2023). Cucumis metuliferus L. Fruits Extract with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antidiabetic Properties as Source of Ursolic Acid. *Separations*, *10*(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/separations10050274>
- Çavuş, S., & Çakal, E. (2012). Synthesis and Characterization of Novel Poly(N-vinylcaprolactam-co-itaconic Acid) Gels and Analysis of pH and Temperature Sensitivity. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *51*(3), 1218-1226. <https://doi.org/10.1021/ie2008746>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2023). *Resumen de compuestos de PubChem para CID 64945, ácido ursólico*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64945>
- Chai, Q., Jiao, Y., & Yu, X. (2017). Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, *3*(1), 6. <https://doi.org/10.3390/gels3010006>
- Chen, M., Zhong, M., & Johnson, J. A. (2016). Light-Controlled Radical Polymerization: Mechanisms, Methods, and Applications. *Chemical Reviews*, *116*(17), 10167-10211. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00671>
- Das, S., Ghosh, S., De, A. K., & Bera, T. (2017). Oral delivery of ursolic acid-loaded nanostructured lipid carrier coated with chitosan oligosaccharides: Development, characterization, in vitro and in vivo assessment for the therapy of leishmaniasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *102*, 996-1008. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.098>
- de Almeida, M. M., Bou-Chacra, N. A., de Castro Lima, C. R. R., do Rosário Matos, J., Filho, E. M., Mercuri, L. P., Baby, A. R., Kaneko, T. M., & Velasco, M. V. R. (2014). Characterization and evaluation of free and nanostructured ursolic acid incorporated in cosmetic formulation using thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *115*(3), 2401-2406. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3346-2>
- De Carvalho, J., Magalhaes, A., & Soccol, C. (2018). Biobased itaconic acid market and research trends—Is it really a promising chemical? *Chimica oggi*, *36*, 56.
- del Prado, A., Navarro, R., Levkin, P., Gallardo, A., Elvira, C., & Reinecke, H. (2016). Dual stimuli-responsive polyamines derived from modified N-vinylpyrrolidones through CuAAC click chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, *54*(8), 1098-1108. <https://doi.org/10.1002/pola.27949>
- Dobić, S. N., Filipović, J. M., & Tomić, S. Lj. (2012). Synthesis and characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/poly(ethylene glycol) dimethacrylate) hydrogels. *Chemical Engineering Journal*, *179*, 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.083>

- El-Husseiny, H. M., Mady, E. A., Hamabe, L., Abugomaa, A., Shimada, K., Yoshida, T., Tanaka, T., Yokoi, A., Elbadawy, M., & Tanaka, R. (2022). Smart/stimuli-responsive hydrogels: Cutting-edge platforms for tissue engineering and other biomedical applications. *Materials Today Bio*, *13*, 100186. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100186>
- Elsayed, M. M. (2019). Hydrogel Preparation Technologies: Relevance Kinetics, Thermodynamics and Scaling up Aspects. *Journal of Polymers and the Environment*, *27*(4), 871-891. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01376-4>
- Escalona Rayo, O., & Quintanar Guerrero, D. (2014). Nanogeles poliméricos: Una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *45*(3), 17-38.
- Fu, Q., Zhang, L., Cheng, N., Jia, M., & Zhang, Y. (2014). Optimización de la extracción de ácidos oleanólico y ursólico de granada (*Punica granatum*L.) flores. *Food and Bioproducts Processing*, *92*(3), 321-327. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.12.006>
- Gallardo, A., Lujan, N., Reinecke, H., García, C., Campo, A. del, & Rodriguez-Hernandez, J. (2017). Chemical and Topographical Modification of Polycarbonate Surfaces through Diffusion/Photocuring Processes of Hydrogel Precursors Based on Vinylpyrrolidone. *Langmuir*, *33*(7), 1614-1622. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04143>
- Gola, A., Kozłowska, M., & Musiał, W. (2022). Influence of the Poly(ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylates on the Selected Physicochemical Properties of Thermally Sensitive Polymeric Particles for Controlled Drug Delivery. *Polymers*, *14*(21), 4729. <https://doi.org/10.3390/polym14214729>
- Gómez-Pulido, L. D. M., González-Cano, R. C., Domínguez, E., & Heredia, A. (2021). Structure determination of oleanolic and ursolic acids: A combined density functional theory/vibrational spectroscopy methodology. *Royal Society Open Science*, *8*(6), 210162. <https://doi.org/10.1098/rsos.210162>
- Gu, Y., Zhao, J., & Johnson, J. A. (2020). Polymer Networks: From Plastics and Gels to Porous Frameworks. *Angewandte Chemie International Edition*, *59*(13), 5022-5049. <https://doi.org/10.1002/anie.201902900>
- Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S., & Phillips, G. O. (2011). Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. En *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering—From Analysis and Modeling to Technology Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/24553>
- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2017). Chapter 5—Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (pp. 67-108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8>
- Habtemariam, S. (2019). Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing Brain Injury, Cerebral Ischemia, Cognition Deficit,

- Anxiety, and Depression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, e8512048. <https://doi.org/10.1155/2019/8512048>
- He, Z., Niu, H., Zheng, N., Liu, S., & Li, Y. (2019). Poly(ethylene-co-propylene)/poly(ethylene glycol) elastomeric hydrogels with thermoreversibly cross-linked networks. *Polymer Chemistry*, 10(35), 4789-4800. <https://doi.org/10.1039/C9PY00824A>
- Helaly, F. M., & Hashem, M. S. (2013). Preparation and Characterization of Poly(β -Amino Ester) Capsules for Slow Release of Bioactive Material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3(3), Art. 3. <https://doi.org/10.4236/jeas.2013.33008>
- Hilmi, B., Hamid, Z. A. A., Akil, H. M., & Yahaya, B. H. (2016). The Characteristics of the Smart Polymer as Temperature or pH-responsive Hydrogel. *Procedia Chemistry*, 19, 406-409. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.031>
- Hoang Thi, T. T., Pilkington, E. H., Nguyen, D. H., Lee, J. S., Park, K. D., & Truong, N. P. (2020). The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers*, 12(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/polym12020298>
- Hsueh, Y.-H., Liaw, W.-C., Kuo, J.-M., Deng, C.-S., & Wu, C.-H. (2017). Hydrogel Film-Immobilized *Lactobacillus brevis* RK03 for γ -Aminobutyric Acid Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), Art. 11. <https://doi.org/10.3390/ijms18112324>
- Huaman, M. A. L., Manco, A. E. Q., de Liss Meza López, F., Carrasco, R. L. A., Chacón, A. M. L., & Khan, S. (2024). Removal of methylene blue dye from water with Fe₃O₄/poly(HEMA-co-AMPS) magnetic hydrogels. *Results in Chemistry*, 7, 101454. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101454>
- Huaman, M. A. L., Vega-Chacón, J., Quispe, R. I. H., & Negrón, A. C. V. (2023). Synthesis and swelling behaviors of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-sodium itaconate) hydrogels as potential drug carriers. *Results in Chemistry*, 5, 100917. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100917>
- Huang, H., Qi, X., Chen, Y., & Wu, Z. (2019). Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(7), 990-999. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.001>
- Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ahmad, R., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Khalil, A. T., Shah, S. A., Alam, M. M., & Badshah, H. (2018). Ursolic acid a promising candidate in the therapeutics of breast cancer: Current status and future implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 752-756. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.096>
- Iyer, A., Jyothi, V. G. S. S., Agrawal, A., Khatri, D. K., Srivastava, S., Singh, S. B., & Madan, J. (2021). Does skin permeation kinetics influence efficacy of topical dermal drug delivery system?: Assessment, prediction, utilization, and integration of chitosan biomacromolecule for augmenting topical dermal drug delivery in skin. *Journal of*

- Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 12(4), 345-355.
https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_82_21
- Jin, H., Pi, J., Yang, F., Wu, C., Cheng, X., Bai, H., Huang, D., Jiang, J., Cai, J., & Chen, Z. W. (2016). Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potent anti-angiogenesis in tumor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6643-6652.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7360-8>
- Jyoti, M. A., Nam, K.-W., Jang, W. S., Kim, Y.-H., Kim, S.-K., Lee, B.-E., & Song, H.-Y. (2016). Antimycobacterial activity of methanolic plant extract of *Artemisia capillaris* containing ursolic acid and hydroquinone against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(4), 200-208.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.11.014>
- Kashyap, D., Tuli, H. S., & Sharma, A. K. (2016). Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences*, 146, 201-213.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>
- Lee, J. H., & Yeo, Y. (2015). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, 125, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>
- Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), Art. 12. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Li, M., He, X., Zhao, R., Shi, Q., Nian, Y., & Hu, B. (2022). Hydrogels as promising carriers for the delivery of food bioactive ingredients. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1006520>
- Li, Q., Wang, L., Chen, F., Constantinou, A. P., & Georgiou, T. K. (2022). Thermoresponsive oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate based copolymers: Composition and comonomer effect. *Polymer Chemistry*, 13(17), 2506-2518.
<https://doi.org/10.1039/D1PY01688A>
- Li, T., Chen, X., Liu, Y., Fan, L., Lin, L., Xu, Y., Chen, S., & Shao, J. (2017). PH-Sensitive mesoporous silica nanoparticles anticancer prodrugs for sustained release of ursolic acid and the enhanced anti-cancer efficacy for hepatocellular carcinoma cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 456-463.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.019>
- Lim, J. Y. C., Lin, Q., Xue, K., & Loh, X. J. (2019). Recent advances in supramolecular hydrogels for biomedical applications. *Materials Today Advances*, 3, 100021.
<https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100021>
- Liu, K., Zhao, Q., Li, B., & Zhao, X. (2022). Raman Spectroscopy: A Novel Technology for Gastric Cancer Diagnosis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.856591>
- Loganathan, S., Valapa, R. B., Mishra, R. K., Pugazhenthii, G., & Thomas, S. (2017). Chapter 4—Thermogravimetric Analysis for Characterization of Nanomaterials. En S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, & R. K. Mishra (Eds.), *Thermal and Rheological*

- Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (pp. 67-108). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00004-9>
- López Carrillo, A., Irazoque Palazuelos, G., & Talanquer Artigas, V. (2022). *Polímeros*. Universidad Nacional Autónoma de México.
<http://www.librosoa.unam.mx/handle/123456789/3413>
- Ludeña Huamán, M. A. (2017). *Método preparativo de ácido ursólico a partir de la planta de medicinal Flor de arena (Clinopodium revolutum)* [Pontificia Universidad Católica del Perú]. <https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/9421>
- Ludeña Huaman, M. A., Tupa Quispe, A. L., Huamán Quispe, R. I., Serrano Flores, C. A., & Robles Caycho, J. (2021). A simple method to obtain ursolic acid. *Results in Chemistry*, 3, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100144>
- Madduma-Bandarage, U. S. K., & Madihally, S. V. (2021). Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(19), 50376. <https://doi.org/10.1002/app.50376>
- Mahinroosta, M., Jomeh Farsangi, Z., Allahverdi, A., & Shakoory, Z. (2018). Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*, 8, 42-55. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>
- Mahmood, A., Patel, D., Hickson, B., DesRochers, J., & Hu, X. (2022). Recent Progress in Biopolymer-Based Hydrogel Materials for Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/ijms23031415>
- Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., Tao, O., Pham, H. M., & Tran, S. D. (2019). Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials*, 12(20), Art. 20. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>
- Martínez, M. T. M. (2017). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos* [Universitat de València, Facultat de Farmàcia]. <https://roderic.uv.es/handle/10550/57123>
- Martínez Martínez, M. T. (2016). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos* [Doctoral thesis]. <https://roderic.uv.es/handle/10550/57123>
- Miatmoko, A., Safitri, S. A., Aquila, F., Cahyani, D. M., Hariawan, B. S., Hendrianto, E., Hendradi, E., & Sari, R. (2021). Characterization and distribution of niosomes containing ursolic acid coated with chitosan layer. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 16(6), 660. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.327512>
- Miloudi, L., Bonnier, F., Bertrand, D., Byrne, H. J., Perse, X., Chourpa, I., & Munnier, E. (2017). Quantitative analysis of curcumin-loaded alginate nanocarriers in hydrogels using Raman and attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(19), 4593-4605. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0402-y>
- Odian, G. (2004). *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons.

- Oyarce, E., Pizarro, G. D. C., Oyarzún, D. P., Zúñiga, C., & Sánchez, J. (2020). Hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate: synthesis, characterization and hydration capacity. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 65(1), 4682-4685. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072020000104682>
- Parameshwaran, R., Sarı, A., Jalaiah, N., & Karunakaran, R. (2018). Chapter 13—Applications of Thermal Analysis to the Study of Phase-Change Materials. En S. Vyazovkin, N. Koga, & C. Schick (Eds.), *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry* (Vol. 6, pp. 519-572). Elsevier Science B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64062-8.00005-X>
- Payomhom, P., Panyain, N., Sakonsinsiri, C., Wongtrakoongate, P., Lertsuwan, K., Pissuwan, D., & Katewongsa, K. P. (2024). Chitosan-Coated Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles Loaded with Ursolic Acid for Breast Cancer Therapy. *ACS Applied Nano Materials*, 7(5), 5383-5395. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c06161>
- Peppas, N. A., & Hoffman, A. S. (2020). 1.3.2E - Hydrogels. En W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, & M. J. Yaszemski (Eds.), *Biomaterials Science (Fourth Edition)* (pp. 153-166). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00014-3>
- Perković, I., Beus, M., Schols, D., Persoons, L., & Zorc, B. (2022). Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Molecular Diversity*, 26(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10147-6>
- Piechocki, K., Kozanecki, M., & Saramak, J. (2020). Water structure and hydration of polymer network in PMEO2MA hydrogels. *Polymer*, 210, 122974. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122974>
- Pironi, A. M., de Araújo, P. R., Fernandes, M. A., Salgado, H. R. N., & Chorilli, M. (2018). Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Ursolic Acid: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(1), 86-93. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1390425>
- Poudel, K., Gautam, M., Maharjan, S., Jeong, J.-H., Choi, H.-G., Khan, G. M., Yong, C. S., & Kim, J. O. (2020). Dual stimuli-responsive ursolic acid-embedded nanophytoliposome for targeted antitumor therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 582, 119330. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119330>
- Qiu, L., Zhao, X., Zu, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wu, W., & Li, Y. (2019). Ursolic acid nanoparticles for oral delivery prepared by emulsion solvent evaporation method: Characterization, in vitro evaluation of radical scavenging activity and bioavailability. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 609-620. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1573739>
- Rizwan, M., Yahya, R., Hassan, A., Yar, M., Azzahari, A. D., Selvanathan, V., Sonsudin, F., & Abouloula, C. N. (2017). pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications. *Polymers*, 9(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/polym9040137>

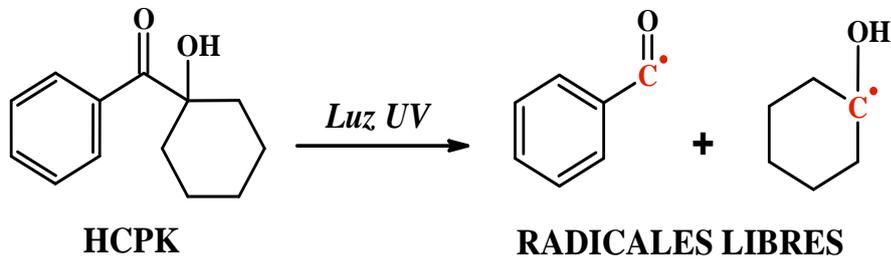
- Robert, T., & Friebel, S. (2016). Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chemistry*, 18(10), 2922-2934. <https://doi.org/10.1039/C6GC00605A>
- Rogic Miladinovic, Z., Micic, M., Mrakovic, A., & Suljovrucic, E. (2017). Smart hydrogels with ethylene glycol propylene glycol pendant chains. *Journal of Polymer Research*, 25(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1408-z>
- Saptaji, K., Iza, N., Widianingrum, S., Mulia, V., & Setiawan, I. (2021). Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) Hydrogels for Contact Lens Applications—A Review. *Makara Journal of Science*, 25(3). <https://doi.org/10.7454/mss.v25i3.1237>
- Shah, F. A., Ruscsák, K., & Palmquist, A. (2019). 50 years of scanning electron microscopy of bone—A comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Research*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0053-z>
- Shanmugam, M. K., Dai, X., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., Sethi, G., & Bishayee, A. (2013). Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochemical Pharmacology*, 85(11), 1579-1587. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.006>
- Shao, J., Fang, Y., Zhao, R., Chen, F., Yang, M., Jiang, J., Chen, Z., Yuan, X., & Jia, L. (2020). Evolution from small molecule to nano-drug delivery systems: An emerging approach for cancer therapy of ursolic acid. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(6), 685-700. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.03.001>
- Song, W., Ko, J., Choi, Y. H., & Hwang, N. S. (2021). Recent advancements in enzyme-mediated crosslinkable hydrogels: In vivo-mimicking strategies. *APL Bioengineering*, 5(2), 021502. <https://doi.org/10.1063/5.0037793>
- Soto, D., & Oliva, H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(2), 154-175.
- Srivastava, P., & Chaturvedi, R. (2010). Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids—Betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid—In cell cultures of *Lantana camara* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(6), 549-557. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9298-3>
- Suhail, M., Shao, Y.-F., Vu, Q. L., & Wu, P.-C. (2022). Designing of pH-Sensitive Hydrogels for Colon Targeted Drug Delivery; Characterization and In Vitro Evaluation. *Gels*, 8(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/gels8030155>
- Temiz, C. (2022). Scanning Electron Microscopy. En *Electron Microscopy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103956>
- Tomić, S. Lj., Babić, M. M., Antić, K. M., Jovašević Vuković, J. S., Malešić, N. B., & Filipović, J. M. (2014). PH-sensitive hydrogels based on (meth)acrylates and itaconic

- acid. *Macromolecular Research*, 22(11), 1203-1213. <https://doi.org/10.1007/s13233-014-2172-0>
- Tomić, S. Lj., Suljovrujić, E. H., & Filipović, J. M. (2006). Biocompatible and bioadhesive hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate, monofunctional poly(alkylene glycol)s and itaconic acid. *Polymer Bulletin*, 57(5), 691-702. <https://doi.org/10.1007/s00289-006-0606-3>
- Uman, S., Dhand, A., & Burdick, J. A. (2020). Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(25), 48668. <https://doi.org/10.1002/app.48668>
- Uzun, İ. (2023). Methods of determining the degree of crystallinity of polymers with X-ray diffraction: A review. *Journal of Polymer Research*, 30(10), 394. <https://doi.org/10.1007/s10965-023-03744-0>
- Vargas, E. L., Velázquez, J. A., Rodrigo, E., Reinecke, H., Rodríguez-Hernández, J., Fernández-Mayoralas, A., Gallardo, A., & Cid, M. B. (2020). PKa Modulation of Pyrrolidine-Based Catalytic Polymers Used for the Preparation of Glycosyl Hydrazides at Physiological pH and Temperature. *ACS Applied Bio Materials*, 3(4), 1955-1967. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01123>
- Varghese, S. A., Rangappa, S. M., Siengchin, S., & Parameswaranpillai, J. (2020). Chapter 2— Natural polymers and the hydrogels prepared from them. En Y. Chen (Ed.), *Hydrogels Based on Natural Polymers* (pp. 17-47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00002-1>
- Vernon-Parry, K. D. (2000). Scanning electron microscopy: An introduction. *III-Vs Review*, 13(4), 40-44. [https://doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X)
- Vesković, A., Bajuk-Bogdanović, D., Arion, V. B., & Popović Bijelić, A. (2023). Spectroscopic Characterization of the Binding and Release of Hydrophilic, Hydrophobic and Amphiphilic Molecules from Ovalbumin Supramolecular Hydrogels. *Gels*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/gels9010014>
- Wang, M., Zhao, T., Liu, Y., Wang, Q., Xing, S., Li, L., Wang, L., Liu, L., & Gao, D. (2017). Ursolic acid liposomes with chitosan modification: Promising antitumor drug delivery and efficacy. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1231-1240. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.014>
- Xu, J., Xu, B., Shou, D., Xia, X., & Hu, Y. (2015). Preparation and Evaluation of Vancomycin-Loaded N-trimethyl Chitosan Nanoparticles. *Polymers*, 7(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/polym7091488>
- Zafar, S., Hanif, M., Azeem, M., Mahmood, K., & Gondal, S. A. (2022). Role of crosslinkers for synthesizing biocompatible, biodegradable and mechanically strong hydrogels with desired release profile. *Polymer Bulletin*, 79(11), 9199-9219. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03956-8>

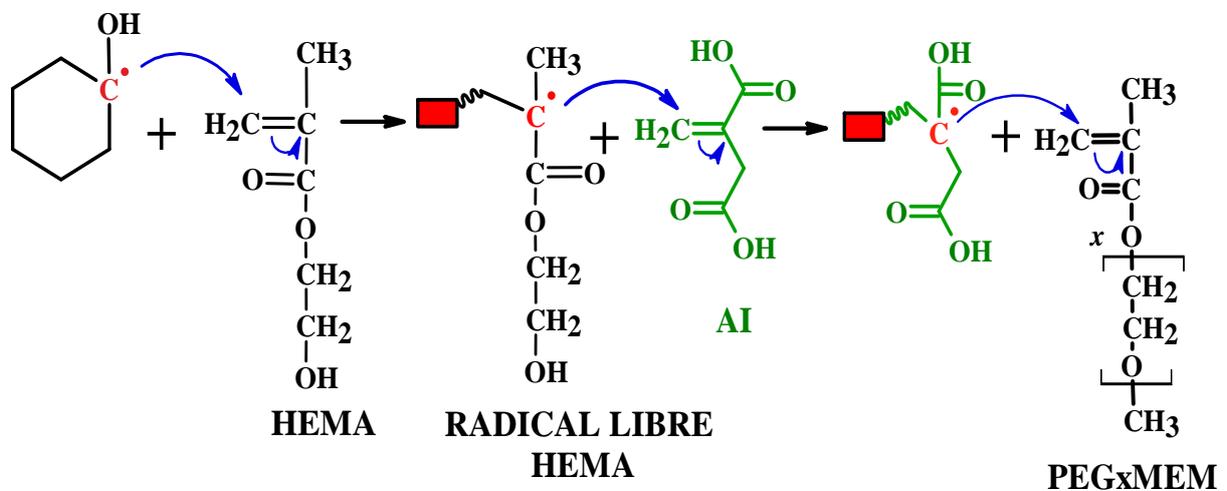
9 APENDICE Y ANEXO

Anexo 1: Etapas de la polimerización radicalaria iniciada por fotoionización.

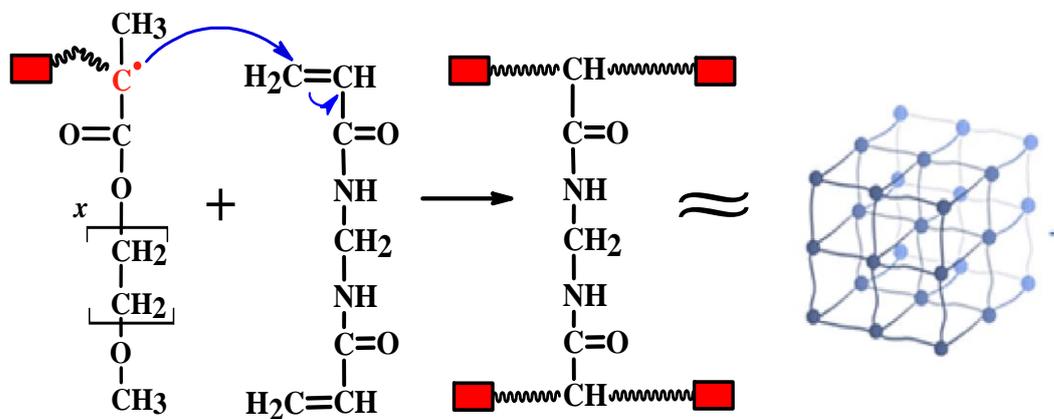
INICIACION



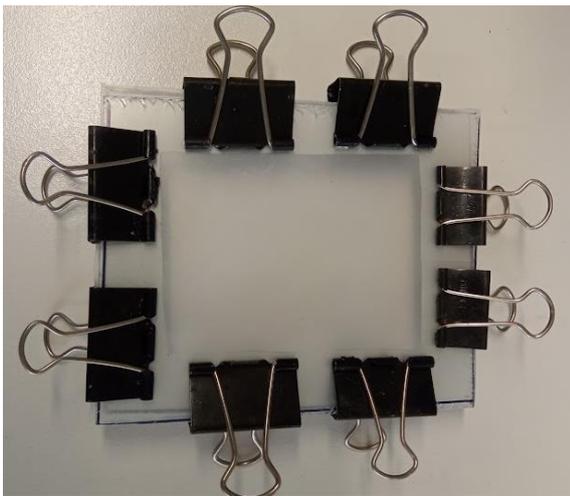
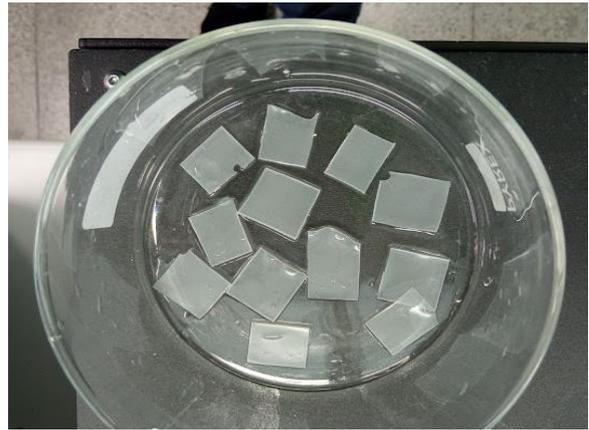
PROPAGACION



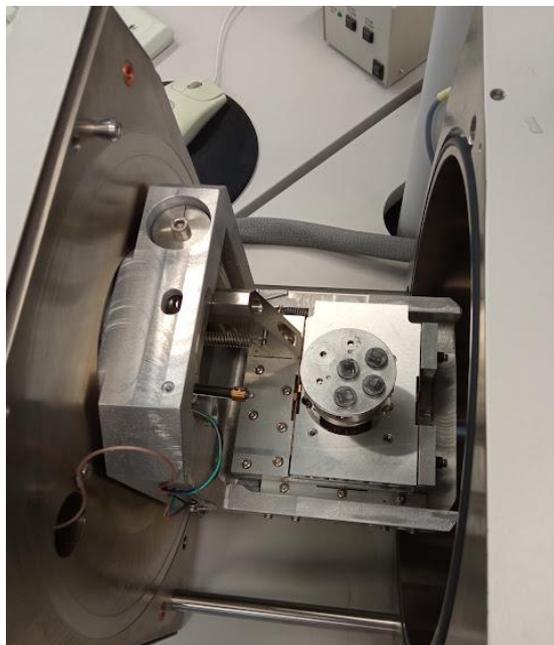
GELACION



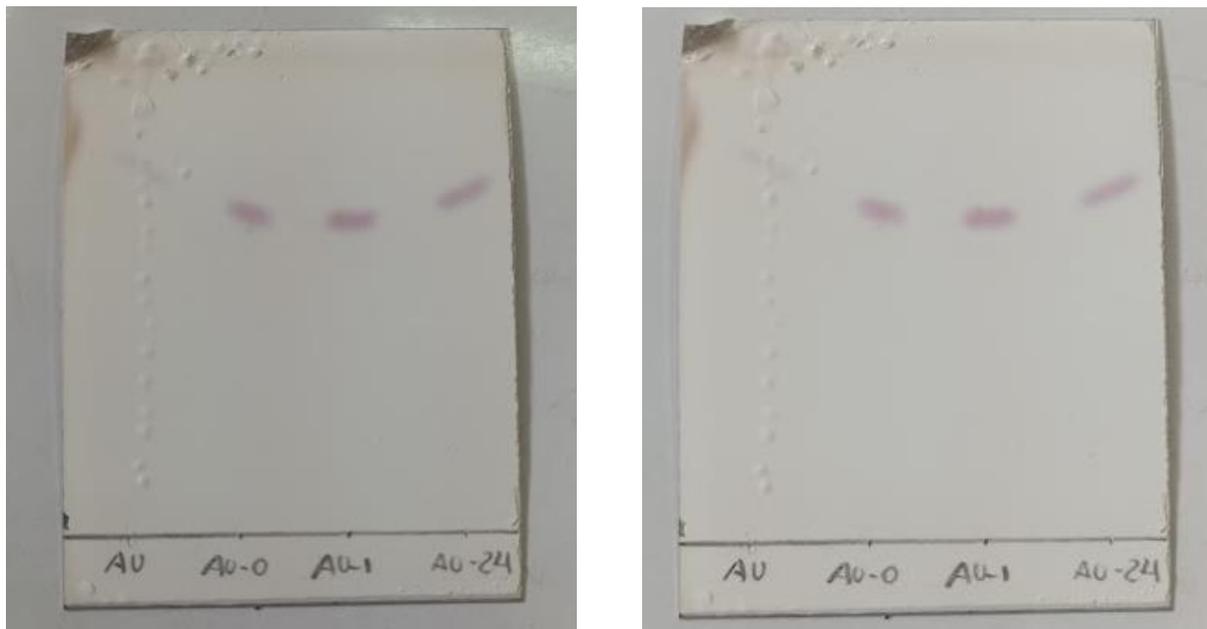
Anexo 2: Hidrogeles obtenidos.



Anexo 3: Caracterización por SEM de los hidrogeles.



Anexo 4: Cromatoplasmas del estudio preliminar de liberación de ácido ursólico desde hidrogeles bajo condiciones simuladas gastrointestinales.



En el estudio preliminar de liberación de ácido ursólico desde los hidrogeles, se realizaron cromatoplasmas bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. El objetivo fue detectar la presencia de AU liberado, para posteriormente realizar su cuantificación. Este proceso nos permitió confirmar que el ácido ursólico estaba efectivamente siendo liberado del hidrogel y asegurarnos de que la cantidad liberada pudiera ser cuantificada con precisión.