



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



# **DISEÑO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOESTRUCTURADOS TRANSPORTADORES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**AMALIA MIRA CARRIÓ**  
**TESIS DOCTORAL 2017**





**D. Antonio V. Ferrer Montiel**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, **DA SU CONFORMIDAD** a la lectura de la tesis doctoral titulada: **“Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas”** presentada por Dña. Amalia Mira Carrió.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 14 de Julio de 2017.

Fdo.: Prof. Dr. Antonio V. Ferrer Montiel





**D. Ricardo Mallavia Marín**, Profesor Titular de la Universidad Miguel Hernández de Elche y **D. Juan Alberto Falcó Graciá**, doctor en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche **CERTIFICAN**: que la tesis doctoral titulada: **“Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas”** presentada por Dña. Amalia Mira Carrió, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 14 de Julio de 2017.

Fdo.: Prof. Dr. Ricardo Mallavia Marín

Fdo.: Dr. J.Alberto Falcó Gracia

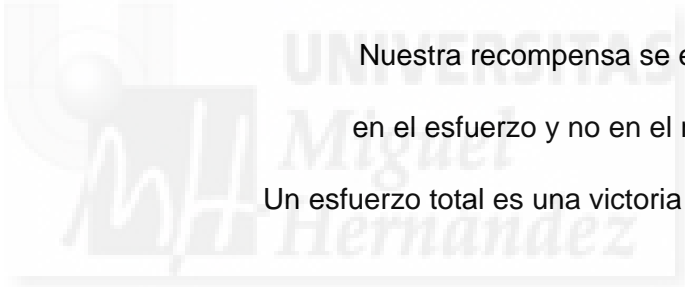


A mis padres









Nuestra recompensa se encuentra  
en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa

Mahatma Gandhi





## **AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar, quiero decir **GRACIAS a mis padres**. Gracias por estar todos los días y a todas horas con una sonrisa y un ánimo insuperables para darme fuerza y apoyarme en todo momento. Sin ellos, su buen humor, su capacidad de tranquilizar, sus ganas de ayudarme en todo lo posible y más, sin todo ello, yo no podría estar hoy aquí. A los dos por estar a mi lado en los peores momentos y los mejores, en los llantos y en las alegrías, de día y de noche; siempre a mi lado. Sacando tiempo de donde no lo había, ganas de jugar con su nieto, quitando problemas donde tú ves murallas, y aportando sus conocimientos en todo instante. Sin ellos esta tesis jamás se podría haber realizado.

Gracias mamá por haber puesto tanto empeño en que realizara el doctorado, sabes que sin tus palabras y día a día no lo hubiese iniciado. Ahora soy muy feliz por haberte hecho caso y haberme reincorporado al mundo de la investigación. Gracias por hacerme ver siempre lo positivo de todas las experiencias vividas. Te admiro por todo y espero algún día parecerme un poco más a ti.

Gracias papá por tu paciencia y buen corazón. Por aguantar tanto mis malos días y seguir sonriendo desde la mañana a la noche aun estando en épocas peores. Por los ánimos de todos los días y ocuparte de jugar con el pequeño a la pelota, la bici y lo que hiciese falta para que su mamá sacara tiempo para investigar. Ojalá también pudiese coger algo de tí para mejorar en el futuro.

**GRACIAS A LOS DOS.** Sin vosotros y vuestra experiencia no hubiese superado algunos de los momentos que hemos pasado a lo largo de estos años. Gracias por enseñarme a ver que "cuando lleguemos a ese río ya cruzaremos ese puente", a sonreír aún cuando no he querido y salir cada día a enfrentarme a nuevos retos con ilusión.

Por todo el cariño y amor incondicional que siempre me habéis dado. OS QUIERO y no tengo palabras para daros las gracias, éstas escritas no dicen ni un mínimo de todo lo que sois para mí. LOS MEJORES PADRES QUE SE PUEDEN TENER. ¡Me encantaría poder educar a mi hijo como vosotros lo habéis hecho conmigo!

A mi **hijo José Antonio**, aunque eres muy pequeñito tus sonrisas diarias, tus abrazos, pequeñas palabritas y besos hacen que una madre se active y coja energías de donde no las hay.

A **José Antonio** por sus aportaciones y ayuda en este trabajo, su paciencia y ánimo sobre todo en los últimos momentos. Muchas gracias por todo, sé el esfuerzo que has hecho.

Gracias a **Ricardo**, mi director de tesis. Por tu paciencia y tu apoyo, sobre todo, estos últimos meses de locos por ayudarme en todo momento con toda tu dedicación y bienestar. Por tu no desesperación con las gráficas y eso que te llevaban por la calle de la amargura. Gracias por tus conocimientos de química aportados que fueron mi inicio en tú laboratorio, siempre vienen bien, aunque los resultados a veces desesperen, jajaja...

Gracias a mi co-director, **Alberto**. Aun pasando muy malos momentos has estado ahí apoyándome y con buen humor. Gracias por todo lo que me has enseñado, tanto experimentalmente desde ensayos bacterianos a celulares como en temas informáticos y de redacción.

A **Amparo** que, aunque ya no estás con nosotros, siempre me acordaré de la ayuda y apoyo que me brindaste en mis inicios cuando estuvimos juntas.

A **Elisa**. Sin ella, este trabajo hubiese sido más duradero. Gracias por todo tu tiempo dedicado a mí, por tu colaboración en todo lo que he necesitado y a cualquier hora. Siempre a mí lado, estuviese yo o no,

trabajando y apoyándome. A mi lado, aprendiendo si no sabía con ganas de formarse para poder echar una mano. Por las risas que nos hemos echado juntas y los llantos. No tengo palabras para agradeceréte. Sin ti, mucho más difícil. Gracias.

A mi compañera **Rebeca**, por su sonrisa diaria, sus palabras de ánimo y consejos. Por esas salidas juntas, esas risas y como no, juegos con mi pequeño y sus "pequeños". Por siempre ayudar cuando lo he necesitado.

A **Zehra, Felipe y Rocio**, tres compañeros con alegría diaria. Por los ratitos esos que, si no estuviesen, muchas veces no podríamos seguir con buen humor.

A **Reyes y M<sup>a</sup>Jose**, por sus conocimientos aportados, su educación, su sonrisa y su acogida en cualquier momento como una más.

A **Maite**, por toda su ayuda prestada en su sala "favorita" llena de equipos. También por tu accesibilidad y ganas de apoyarme.

A **Marcela**, por esos momentos de relax en tu laboratorio y esos conocimientos aportados que siempre me han venido bien. Por tus ánimos y consejos, gracias.

A **Javier y José Luis**. Gracias por prestarme cualquier equipo y tiempo que he necesitado. Javier, tu centrifuga me echará de menos!!!

A todas aquellas personas que, aunque no nombre están conmigo y lo han estado a lo largo de estos años dándome aliento para seguir día tras día elaborando esta ilusión.





Para el investigador no existe alegría comparable  
a la de un descubrimiento por pequeño que sea.

Alexander Fleming





## **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>5</b>
1. Los polímeros en nanotecnología. Antecedentes	10
2. Polímeros transportadores	12
3. Polímeros señalizadores	21
<b>CAPÍTULO II: OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO III: NANOPARTÍCULAS</b>	<b>37</b>
<b>1.Introducción</b>	<b>39</b>
1.1. Tipos de nanopartículas	43
1.2. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas	48
1.3. Aplicaciones de las nanopartículas	54
1.4. Bacterias	56
1.4.1. Bacterias seleccionadas para desarrollar los ensayos	60
1.5. Antibióticos	62
1.5.1. Antibióticos seleccionados	66
1.5.1.1. Aminoglucósidos	66
1.5.1.2. Quinolonas	67
1.5.1.3. Cefalosporinas	69
<b>2. Material y métodos</b>	<b>73</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>75</b>
2.1.1. Polímero transportador	75
2.1.2. Polielectrolitos conjugados	75
2.1.3. Antibióticos	77

2.1.4. Otros reactivos	78
2.1.5. Cultivos	79
2.1.5.1. Eucariotas	79
2.1.5.2. Procariotas	80
<b>2.2. Instrumentación y metodología</b>	<b>81</b>
2.2.1. Metodología de preparación de nanopartículas	81
2.2.2. Espectroscopia de correlación de fotones	83
2.2.3. Microscopía óptica de fluorescencia	83
2.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	85
2.2.5. Espectroscopía de fluorescencia	86
2.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución	87
2.2.6.1. Método de ciprofloxacino	90
2.2.6.2. Método de cefotaxima	90
2.2.6.3. Método de amikacina y neomicina	91
2.2.7. Ensayos de actividad antimicrobiana	94
2.2.7.1. Consideraciones previas	94
2.2.7.2. Determinación de la $CI_{90}$ mediante el análisis de unidades formadoras de colonias (UFCs)	95
2.2.7.3. Determinación de la $CI_{90}$ mediante el análisis de la DO620	96
2.2.7.4. Determinación de la CMI mediante el método de la microdilución en caldo de cultivo	97
2.2.8. Ensayos de citotoxicidad	103
2.2.8.1. Ensayo de viabilidad MTT de los polielectrolitos conjugados en línea celular	103
2.2.9. Análisis estadístico	105

<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>107</b>
3.1. Caracterización de las nanopartículas(NPs) de PMVEMA-ES con y sin polielectrolitos	109
3.1.1. Espectroscopia de correlación de fotones (“dynamic light scattering”; DLS)	109
3.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	114
3.2. Caracterización de las NPs de PMVEMA-ES con y sin antibióticos y/o polielectrolitos	119
3.2.1. Espectroscopia de correlación de fotones (DLS) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	120
3.3. Espectroscopia de fluorescencia	124
3.3.1. Espectroscopia de fluorescencia de nanopartículas cargadas con los polielectrolitos conjugados	125
3.3.2. Espectroscopia de fluorescencia de nanopartículas cargadas con los polielectrolitos conjugados y distintos antibióticos	128
3.4. Estudio de la interacción de los PCs y NPs con muestras biológicas mediante microscopía.	130
3.4.1. Detección de PCs (solos o en NPs) en muestras biológicas mediante microscopía óptica de fluorescencia	130
3.4.1.1. Descripción de la señalización de bacterias y/o células eucariotas con PCs mediante microscopía óptica de fluorescencia	131
3.4.1.2. Determinación de la localización/internalización de NPs fluorescentes en células eucariotas mediante microscopía óptica de fluorescencia	137

3.4.2. Determinación de la internalización/locaclización de las NPs en cultivo primero mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)	140
3.5. Viabilidad celular	142
3.5.1. Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con PCs y NPs (con y sin PCs) de líneas celulares	142
3.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los PCs y las diferentes formulaciones nanoparticuladas	144
3.6.1. Estudio de la actividad antimicrobiana de los PCs	145
3.6.1.1. Selección de métodos para determinar la actividad antimicrobiana de los PCs	145
3.6.1.2. Descripción del efecto de la composición de los tampones en la actividad antimicrobiana de los PCs	147
3.6.1.3. Determinación de la CMI de los PCs mediante el método de la microdilución en caldo para las diferentes especies bacterianas	150
3.6.2. Determinación de la CMI de las formulaciones con antibióticos mediante el método de la microdilución en caldo para las diferentes especies de bacterias	151
3.6.2.1. CMI de las formulaciones con amikacina por el método de microdilución	152
3.6.2.2. CMI de las formulaciones con neomicina por el método de microdilución	154
3.6.2.3. CMI de las formulaciones con ciprofloxacino	



por el método de microdilución	<b>155</b>
3.6.2.4. CMI de las formulaciones con cefotaxima por el método de la microdilución	<b>156</b>
<b>CAPÍTULO IV: NANOFIBRAS</b>	<b>159</b>
<b>1.Introducción</b>	<b>161</b>
1.1. Nanofibras en medicina	<b>163</b>
1.2. Electrohilatura	<b>165</b>
1.3. Electrohilatura: principios de la técnica	<b>165</b>
1.4. Electrohilatura: control operacional	<b>168</b>
1.5. Aplicaciones generales de nanofibras	<b>173</b>
1.5.1. Aplicaciones biomédicas	<b>175</b>
1.6. Administración transdérmica	<b>178</b>
1.7. Agente neoplásico y terapia fotodinámica	<b>180</b>
<b>2.Material y métodos</b>	<b>187</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>189</b>
2.1.1. Polímero transportador	<b>189</b>
2.1.2. Polielectrolitos señalizadores	<b>189</b>
2.1.3. Antineoplásico	<b>190</b>
2.1.4. Otros reactivos	<b>190</b>
2.1.5. Cultivos celulares	<b>191</b>
<b>2.2. Instrumentación y metodología</b>	<b>191</b>
2.2.1. Preparación de las disoluciones para la preparación de nanofibras	<b>191</b>
2.2.1.1. Disoluciones madre poliméricas	<b>191</b>
2.2.1.2. Disoluciones madre poliméricas con polielectrolitos conjugados	<b>192</b>

2.2.1.3. Disoluciones madre poliméricas con 5-ALA	192
2.2.1.4. Disoluciones madre poliméricas con polielectrolitos conjugados y 5-ALA	192
2.2.2. Elaboración de nanofibras mediante electrohilatura	193
2.2.3. Microscopía óptica de fluorescencia	197
2.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	197
2.2.5. Microscopía óptica de transmisión (TEM)	198
2.2.6. Análisis por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	198
2.2.7. Espectroscopia de fluorescencia en estado sólido	199
2.2.8. Estudios de permeabilidad en piel	200
2.2.9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	203
2.2.10. Ensayos de citotoxicidad	205
2.2.11. Ensayos de acumulación de PpIX	206
2.2.12. Actividad fototerápica	207
<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>209</b>
3.1. Microscopía óptica de fluorescencia	211
3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	220
3.3. Microscopía óptica de transmisión (TEM)	221
3.4. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	224
3.5. Espectroscopia de fluorescencia en estado sólido	227

3.6. Estudios <i>in vitro</i> de permeabilidad en piel	233
3.7. Ensayos <i>in vitro</i> con las líneas celulares HaCaT y SW480	245
3.7.1. Determinación de la toxicidad producida en oscuridad por el 5-ALA y las disoluciones de la diferentes nanofibras sintetizadas	245
3.7.2. Determinación de la acumulación de PpXI en células tras su tratamiento con las fibras experimentales en disolución	247
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</b>	<b>251</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>257</b>







## **ABREVIATURAS**



<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Agua</b>	Agua Milli Q
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CE</b>	Concentración de antibiótico encapsulda
<b>CI<sub>90</sub></b>	Concentración inhibitoria al 90%
<b>CIG</b>	Concentración inicial del gradiente antibiótico
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DLS</b>	Espectroscopia de correlación de fotones
<b>DMEM</b>	Medio Dulbecco's con alta concentración de glucosa y L-glutamina y bicarbonato.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b><i>E. coli</i> R</b>	Escherichia coli resistente
<b><i>E. coli</i> S</b>	Escherichia coli sensible
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EE</b>	Eficacia de encapsulación
<b>ELSD</b>	Detector evaporativo de dispersión de luz.
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FCS</b>	Suero fetal bovino
<b>GPC</b>	Cromatografía permeación en gel
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>k</b>	Factor de retención
<b>LB</b>	Caldo de cultivo Luria Bertani
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MH</b>	Caldo de cultivo Mueller Hinton
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>Mu</b>	Peso molecular unitario
<b>Mw</b>	Peso molecular
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NFs</b>	Nanofibras
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>PBS</b>	Tampon fosfato salino
<b>PCs o CPEs</b>	Polielectrolitos conjugados
<b>PDI</b>	Índice de polidispersión
<b>PFNT<sup>+</sup></b>	Poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-fluoreno- <i>alt</i> -naftaleno-[2,3c]-1,2,5-tia-diazol}

<b>PFP<sup>+</sup></b>	Poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)-hexilo]-2,7-fluoreno- <i>alt</i> -1,4-fenileno}
<b>PG</b>	Peptidoglicano
<b>PGA</b>	Poli (glicólico)
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico
<b>PLGA</b>	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
<b>PLLA</b>	Poli (L-láctico)
<b>PMVEMA</b>	Poli [metil vinil éter - <i>alt</i> -(anhídrido maleico)]
<b>PMVEMA-Ac</b>	Poli(metil vinil éter- <i>alt</i> -ácido maleico)
<b>PMVEMA-ES</b>	Poli(metil vinil eter- <i>alt</i> -monoetilester ácido maleico)
<b>PZ</b>	Potencial Z.
<b>R</b>	Radio
<b>Rh</b>	Radio hidrodinámico
<b><i>S. aureus</i> R</b>	Staphylococcus aureus resistente
<b><i>S. aureus</i> S</b>	Staphylococcus aureus sensible
<b><i>S. pneumoniae</i> R</b>	Streptococcus pneumoniae resistente
<b><i>S. pneumoniae</i> S</b>	Streptococcus pneumoniae sensible
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>TEM</b>	Microscopio electrónico de transmisión
<b>TFD</b>	Terapia fotodinámica
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UCFs</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>V<sub>r</sub></b>	Volumen relativo





**CAPÍTULO I**

**INTRODUCCIÓN GENERAL**



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

En los últimos años, la nanotecnología ha adquirido un fuerte impulso gracias a las soluciones que propone tanto para el desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas como para la mejora de las convencionales<sup>1,2</sup>. En gran medida, estos avances se deben a la introducción de materiales inéditos que permiten el diseño de nanoestructuras que responden a aquellas limitaciones que suponen importantes impedimentos para la medicina tradicional<sup>3-6</sup>. El espectacular avance de la nanotecnología al combinarse con el progreso de la ciencia y la tecnología de polímeros, en particular, abre campos emergentes para la búsqueda de soluciones a problemas complejos en diversos ámbitos sociales que existen actualmente.

Entre los grandes retos del siglo XXI figuran tanto la capacidad de detectar de forma precoz la presencia de enfermedades y defectos genéticos que las favorezcan, así como también la de curar y regenerar aquellos órganos y tejidos que estén dañados dentro de nuestro cuerpo. En este sentido, recientemente ha aparecido la expresión “teragnosis”, acuñada por Zhang y col.<sup>7</sup>, que hace referencia a la mezcla de ambos elementos, diagnosis y terapia, antes citados. De esta manera nace una nueva forma de afrontar el problema, diagnosticar y tratar un problema al mismo tiempo con materiales preparados a tal fin. De encontrar una solución a estos retos dependerá el futuro de la calidad de vida de los seres humanos en las próximas décadas.

La nanomedicina y la nanobiotecnología, disciplinas fronteras de la nanotecnología con la medicina y la biotecnología, son áreas emergentes en ciencia y tecnología que prometen obtener grandes avances en esta dirección a la vista de los últimos logros alcanzados.

Uno de los progresos más interesantes en nuevos tratamientos y sistemas de diagnóstico es la preparación de polielectrolitos diagnósticos y terapéuticos en combinación con la nanotecnología. Estos polímeros teragnósticos son una de las “nanomedicinas” probadas con más éxito<sup>3,4,8</sup> debido principalmente a la posibilidad que ofrece su arquitectura polimérica de poder manipularse, permitiendo, así, combinar diversos fármacos en la misma cadena.

En los últimos 20 años, la nanomedicina, aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud, se está desarrollando fuertemente en laboratorios de todo el mundo gracias a esta asociación de tecnologías de polímeros y la biotecnología<sup>3,4</sup>. Así, se están promoviendo nuevas terapias frente a enfermedades de carácter relevante entre las que se encuentran el cáncer y enfermedades degenerativas. Todo ello sin dejar de lado las enfermedades de origen infeccioso que además de generar por sí solas una afección, pueden complicar procesos en pacientes con otros diagnósticos<sup>3,8</sup>.

En la actualidad, las infecciones por microorganismos patógenos son una gran preocupación en hospitales de todo el mundo por el alto índice de mortalidad que causan, fundamentalmente por la elevada aparición de resistencias al limitado arsenal de antibióticos conocidos. Por tanto, los materiales poliméricos con propiedades antimicrobianas se han convertido en una prometedora fuente de nuevos compuestos antibióticos y son foco de gran interés tanto desde el punto de vista académico como industrial.

Las propiedades de estos materiales aplicados a la nanomedicina hacen que puedan aportar soluciones para otras enfermedades tales como las tumorales, enfermedades con una alta prevalencia e impacto en nuestra sociedad. En particular, en este

trabajo hemos buscado aplicaciones, utilizando materiales poliméricos, para aquellas enfermedades tumorales que implicasen una terapia de administración tópica, como la terapia fotodinámica (TFD)<sup>9,10</sup>, la cual también es aplicable a otros tipos de cáncer como el de vejiga o colon. La TFD, es un tratamiento que acumula una sustancia fluorescente en células cancerígenas y que se activa por excitación lumínica. En el estado excitado reacciona con el oxígeno triplete generando oxígeno singlete (“*diradical*”) que daña las células cancerígenas<sup>9,10</sup>.

En el estudio de una nanoestructura con polielectrolito y un agente curativo, sea bien con fines transportadores, fines terapéuticos o simplemente esté incluido en la preparación del ensayo, es necesario considerar al complejo nanoestructura-célula como una entidad biológica nueva y dinámica. Si bien existen numerosos estudios que han examinado la interacción nanopartícula-célula, no hemos hecho más que empezar en nuestra comprensión del papel de las propiedades de superficie de los nanomateriales en tales interacciones, entre otros motivos por la gran cantidad de variables en las condiciones experimentales utilizadas. Este desconocimiento hace que la sistemática de este estudio sea un desafío en sí mismo. Algunos de los retos que pueden surgir son:

- I) reproducir el control de las propiedades de superficie de las nanopartículas,
- II) normalizar las diferencias en la solubilidad de los nanomateriales en diferentes medios,
- III) estudiar la agregación de las nanopartículas con diferentes tamaños, y

IV) diferenciar las respuestas en función del tipo de células a analizar.

### **1. Los polímeros en nanotecnología. Antecedentes**

En nanotecnología, los polímeros aplicados a esta ciencia son materiales macromoleculares en auge debido a que la modificación de su estructura química y/o de métodos físicos de fabricación producen cambios en sus propiedades fisicoquímicas como tamaño, carga, hidrofobicidad, ramificación y degradación. En la química de polímeros, la estructura y la función están íntimamente relacionadas, por lo que modificar la estructura final del polímero para encontrar la función deseada es una prioridad del investigador. Brevemente, un polímero es una macromolécula o molécula grande constituida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples denominadas monómeros. La longitud de la cadena polimérica viene definida por el grado de polimerización, es decir, por el número de unidades monoméricas que se repiten en la cadena. Las repeticiones pueden ser lineales o ramificadas, formando redes tridimensionales. La naturaleza química del monómero, el número y la forma en la que se disponen las cadenas repetidas son claves para estudiar las interacciones macromoleculares con otras entidades relacionadas con el ámbito de la salud.

Por otra parte, la nanotecnología es un conjunto de ramas científicas dedicadas a la ciencia a las técnicas que estudian, manipulan y obtienen de manera controlada materiales de dimensiones muy reducidas. Esta escala abarca desde el nanómetro hasta la micra (1000 nm), aunque los límites varían según el autor o el tipo de aplicaciones<sup>11</sup>. La mayoría coincide con el límite inferior que

viene impuesto por el tamaño del átomo de hidrógeno. Sin embargo, las nanopartículas han sufrido cambios en los límites superiores, por ejemplo, considerar valores inferiores a 500 nm (referencia al tamaño de mesoporos de sílice) o hasta los 100 nm que se ha convenido para las llamadas partículas ultrafinas<sup>12</sup>. En una revisión reciente<sup>13</sup>, las nanopartículas son consideradas partículas coloidales con tamaños aproximadamente entre 10-1000 nm. En nuestro caso, algunos ejemplos dimensionales típicos de entidades macromoleculares son el fosfolípido, el fullereno, dobles hélices de ácidos nucleicos, bicapas de lípidos, virus, etc. Es evidente que esta nueva terminología y su influencia en la vida cotidiana está siendo cada vez más cercana y habitual. Este camino ya se recorrió hace unos años por la ciencia de los materiales poliméricos que tradicionalmente se conocían como plásticos y que, poco a poco, han ido introduciéndose en nuestro entorno hasta situarse entre los materiales más apreciados por su versatilidad y economía.

Desde el célebre trabajo de Folkman y Long sobre los polímeros de silicona<sup>14</sup>, han surgido muchos grupos de investigación cuyo trabajo ha estado encaminado a hacer que estos materiales, algunos ya adaptados al mundo NANO, sigan siendo exitosos. Por un lado, algunos autores apuntan a evitar caer en delimitaciones cuando aún se pueden descubrir nuevos materiales e incluso a diseñar y sintetizar nuevos materiales dentro de una misma clase de polímeros<sup>15</sup>. Recientemente, otros autores apuestan por hablar del “*final del principio*”<sup>16</sup> como una actitud a seguir después de cincuenta años realizando pruebas de concepto y haciendo que este largo camino, directamente avance hacia aspectos más directos y relacionados con tratamientos farmacológicos y clínicos.

En los últimos años, la nanomedicina ha sido utilizada en combinación con la ciencia de polímeros para desarrollar moléculas,

bien sean hidrófilas o hidrófobas para abordar la encapsulación y poder dirigir los principios activos, aunque con diferentes estrategias para su liberación. Los diferentes mecanismos por los que se liberan las sustancias están relacionados con el tamaño de las moléculas generadas. Lógicamente, el problema es diferente si se trata de macromoléculas o de moléculas pequeñas. Las macromoléculas tienen baja biodisponibilidad, poca estabilidad, una degradación proteolítica e hidrolítica y además baja permeabilidad y corta vida media en el sistema circulatorio. Por otro lado, las moléculas pequeñas en muchas ocasiones tienen falta de solubilidad, biodistribución inespecífica y bajos índices terapéuticos<sup>17</sup>.

## **2. Polímeros transportadores**

Con el término transportador se hace referencia a la función que va a ejercer el material en esas estructuras. En este caso será únicamente el actuar a modo de matriz para trasladar sustancias a una determinada ubicación y no con el fin terapéutico de ser ellos los que ejercerán la acción en sí misma.

Hasta el presente, los polímeros terapéuticos son unas moléculas con alto grado de interés y buenos resultados, sobre todo, por la facilidad de control de su estructura<sup>6</sup>. Estos son biocompatibles y/o biodegradables, es decir, son unos materiales que pueden ser utilizados en un sistema vivo sin causar reacciones alérgicas o inmunes y se degradan por acción biológica.

La búsqueda y desarrollo de formulaciones transportadoras de polímeros se debe en gran medida a la comparación que existe entre la respuesta nanoscópica y la macroscópica que permite aplicaciones únicas en muchos casos, empleando métodos de preparación fáciles. En general, los nanomateriales poliméricos pueden subdividirse



atendiendo a la naturaleza de los materiales que lo componen en orgánicos e inorgánicos, o también en base a su morfología: nanopartículas, nanofibras, etc. Uno de los aspectos más destacados de los nuevos materiales está en la relación superficie y tamaño, que es mucho más alta que el volumen y que redundará en las propiedades del polímero final.

Con el uso de cualquier tipo de polímero, los sistemas avanzados de visualización y liberación de fármacos deben tener en cuenta el control farmacocinético, la toxicidad, la inmunogeneidad, la especificidad y la eficacia del medicamento. En el grupo de **polímeros transportadores** de fármacos se encuentran los dendrímeros, biopolímeros y polímeros sintéticos solubles o insolubles, los cuales son formulados como nanopartículas u otros tipos de nanoestructuras. Otras formulaciones emplean complejos polímeros, dendriplejos, liposomas, micelas y nanogeles<sup>6</sup>.

Entre todos estos materiales, los biopolímeros han sido tradicionalmente los más usados para la fabricación de nanoestructuras con aplicación en biomedicina. Actualmente se dispone de polímeros de distinto origen, natural o sintético, para la formulación de sistemas nanoestructurados.

- **Naturales:** encontramos las proteínas, polisacáridos y polihidroxialcanoatos. Entre las proteínas, la albúmina ha sido muy utilizada en la fabricación de micropartículas y nanopartículas<sup>18,19</sup>. La albúmina es un polímero no antigénico, de fácil preparación y biodegradable. Esta última cualidad la comparte con el colágeno empleado en la industria farmacéutica, que además es biocompatible y bioreabsorbible<sup>20</sup>. Otro polímero natural a destacar entre otros es la celulosa que es un polisacárido que resulta económico para la fabricación de nanopartículas y posee diversidad de formas que en

algunos casos son accesibles para la modificación química<sup>21</sup>. A este polisacárido le sumamos el alginato, quitosano, pululano, dextrano y ácido hialurónico que han tenido que derivatizarse por su alta solubilidad en agua y rápida degradación en el cuerpo.

- **Sintéticos:** tenemos los poliésteres, polifosfacenos, polialquilcianoacrilatos, polianhídridos y copolímeros en bloque micelares. En cuanto a los polímeros sintéticos, la lista se reduce a pocos los que han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso biomédico. Entre los aceptados, destacan los polilácticos, como son poli (L-láctico) (PLLA) y poli (DL-ácido láctico)<sup>22</sup> y, también poli (glicólico) (PGA) y sus copolímeros<sup>23</sup>. Estos polímeros presentan una buena compatibilidad tisular y no son tóxicos. Son biodegradables y se utilizan como excipientes para micropartículas y nanopartículas de uso humano. Otro polímero sintético muy implementado en biomedicina es la poli (7-caprolactona) que se considera un polímero no tóxico, compatible con los tejidos y es permeable a fármacos de bajo peso molecular. Por otra parte, es un material biocompatible que se degrada fácilmente por hidrólisis de sus enlaces éster. La reducida velocidad de degradación lo hace idóneo como sistema de liberación de fármacos en aplicaciones que no pueden ser cubiertas por otros polímeros más fácilmente degradables (es más hidrófobo que los homopolímeros y copolímeros de los ácidos lácticos y glicólicos y, por tanto, su degradación es más lenta que la de estos últimos)<sup>24</sup>. Por estas y otras razones hacen que este polímero haya sido utilizado en diversos trabajos de encapsulación de fármacos y proteínas como la ciclosporina A<sup>24-28</sup>.

En cuanto a los copolímeros en bloque micelares, en los últimos años han sido estudiados por sus aplicaciones en la elaboración de sistemas de transporte de fármacos. Están formados

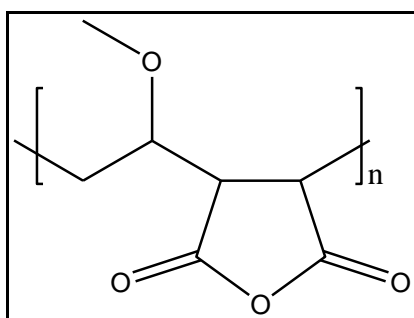
por macromoléculas constituidas por bloques poliméricos dispuestos en una secuencia lineal. Algunos ejemplos son plurónicos, polietilenglicol-fosfolípidos conjugados, PEG-b-poliésteres y PEG-b-poli(L-aminoácidos)<sup>29</sup>. Los de tipo anfifílico poseen bloques lipofílicos unidos a bloques hidrofílicos y poseen propiedades tensioactivas, formando distintos tipos de asociaciones, así como micelas y estructuras líquido cristalinas, que pueden actuar como excelentes vehículos de principios activos<sup>30</sup>.

Aunque desde hace más de 30 años se vienen utilizando polímeros biodegradables como es el caso del PLA y PLGA, en los últimos años se han enfocado para su uso en humanos. Un caso de estos son los polianhídridos, los cuales se fabricaron con el objetivo de obtener un material que fuese biodegradable y que su tiempo de degradación se ajustase al tiempo de aplicación. Dentro de los polianhídridos encontramos diversos tipos como pueden ser los alifáticos, aromáticos, copolímeros derivados de ambos, polianhídridos derivados de ácidos grasos y sus entrecruzados. En general, los polímeros alifáticos tienen una degradación rápida mientras que los aromáticos tardan varios años. Los polianhídridos poseen alta hidrofobicidad y por ello presentan una erosión superficial en la preparación de sistemas de liberación controlada<sup>31,32</sup>.

En esta tesis doctoral, el grupo de copolímeros de alquil vinil éteres y anhídrido maleico se ha seleccionado para el desarrollo de ambas nanoestructuras propuestas en los objetivos para encapsular distintos fármacos. El motivo por el cual se eligieron fue por sus características de biodisponibilidad y biocompatibilidad, que se describen a lo largo de las siguientes líneas, así como por sus características hidrofílicas modificables.

El poli [metil vinil éter *-alt-* (anhídrido maleico)] (PMVEMA), del inglés poly [methyl vinyl ether-*alt-*(maleic acid)], comercializado por Ashland bajo la marca registrada de Gantrez®, es el copolímero alternado del derivado del metil-éter-vinilo y del anhídrido maleico. Su baja toxicidad, con una dosis letal del 50% (LD<sub>50</sub>) de 8 g/kg por vía oral en cerdo de guinea, y su alta biocompatibilidad, los convierten en excelentes candidatos para el diseño de polímeros terapéuticos. Además, su precio y fácil obtención los hacen ventajosos para su uso en tecnología farmacéutica<sup>33</sup>.

El copolímero de metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico se sintetiza por polimerización radical de los monómeros metil vinil éter y anhídrido maleico empleando un iniciador térmico de radicales, como un peróxido o peréster, a temperaturas moderadas-altas comprendidas entre 50-150 °C. Los tiempos de reacción oscilan entre 2 y 9 h en función de las condiciones experimentales. Se emplean disolventes como tolueno y diclorometano, o incluso el propio monómero de éter en exceso, produciendo altos pesos moleculares en una polimerización en masa (figura 1).



**Figura 1:** Estructura química de poli [metil vinil éter-*alt-* (anhídrido maléico)].

Los polímeros de PMVEMA poseen unas características que los hacen atractivos para un desarrollo de nanoestructuras. Entre sus propiedades cabe destacar la amplia variabilidad de masas moleculares, cubriendo un rango que oscila entre 213-1980 kg/mol, pudiendo escoger la más adecuada para elaborar las nanoestructuras requeridas. Su viscosidad Brookfield a 25 °C varía de entre 15-35 hasta 85-1400000 (mPa; 5-10% p/p) dependiendo de de la masa molecular. Este dato resulta útil a la hora de realizar disoluciones para mejorar la solubilidad y sus aplicaciones en la fabricación de nanoestructuras. Las temperaturas de transición vítrea, que no presentan mucha variabilidad entre ellos se mantienen entre 151-154 °C y con ellas se puede saber cuando disminuye su densidad, dureza y rigidez y también donde disminuye su porcentaje de elongación en función de la temperatura.

El PMVEMA presenta baja solubilidad en etanol e isopropanol y es muy soluble en acetona. Al mismo tiempo, es poco soluble en agua, sin embargo, en contacto con ella, el grupo anhídrido puede hidrolizarse, hinchándose, induciendo dispersión y posterior disolución del copolímero<sup>34,35</sup>. Por ello, los factores que influyen en el proceso de disolución del polímero son I) la temperatura, II) el pH, III) la masa molecular y IV) el grado de sustitución de los grupos anhídrido. La hidrólisis de una dispersión del PMVEMA al 10% en agua dura aproximadamente unas 8 h a 40 °C, mientras que a 90 °C la reacción tiene una duración de 15 min<sup>36</sup>. Estos copolímeros aumentan su disolución en medio ácido puesto que presentan un pK medio básico o neutro alrededor de 5,33 para la forma monoéster etílico y de 3,51 y 6,41 para el derivado ácido de menor peso molecular.

Los copolímeros de PMVEMA son lineales alternados y muy reactivos. Por otro lado, esta reactividad química depende del grupo anhídrido, el cual puede reaccionar fácilmente con un gran número de

grupos nucleofílicos, incluyendo el agua, los alcoholes, los ácidos y las bases. Esta propiedad permite la formación de diferentes derivados (figura 2). Entre éstos destacan: el PMVEMA ácido (PMVEMA-Ac) y el PMVEMA éster (PMVEMA-ES) aunque también se podría obtener el PMVEMA en forma de sal. Su derivado ácido y monoéster etílico son los que se emplearán para el desarrollo de las formas farmacéuticas propuestas.

**PMVEMA-Ac**: es el ácido libre de la forma anhídrido (PMVEMA). Es soluble en agua y en etanol. Es un polvo fluido que se disuelve completamente en agua dando una solución transparente. Las disoluciones del ácido, se pueden obtener a partir del anhídrido en agua y con más o menos rapidez en función de la temperatura. Dentro del derivado ácido, se pueden encontrar diversos ácidos atendiendo a su peso molecular. En el caso que nos concierne, el de un peso molecular de 216 kg/mol, polidispersión (PDI) de 2,71 y una temperatura vítrea que está en 139 °C.

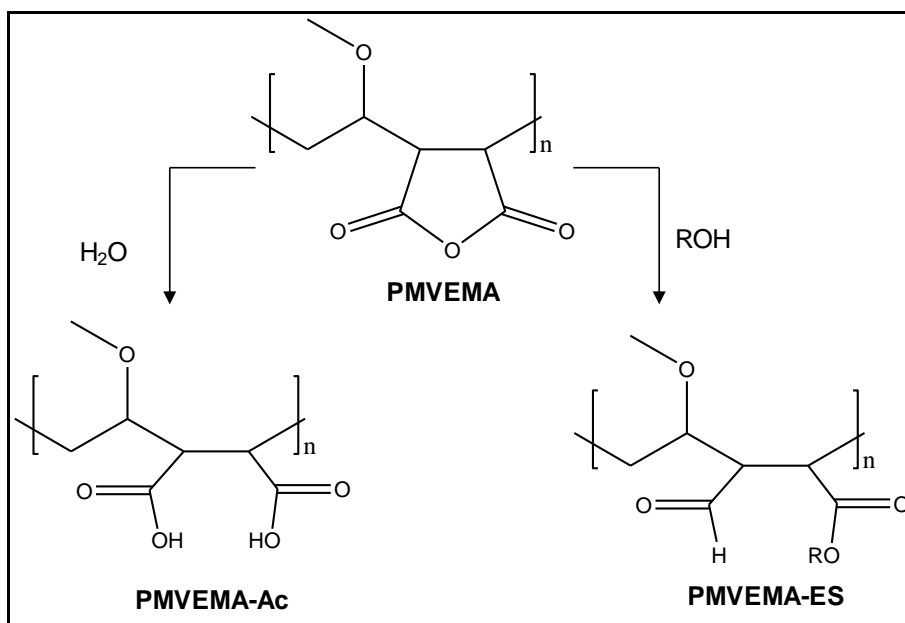
Las soluciones acuosas de ácido sin neutralizar presentan una viscosidad creciente conforme se aumenta la concentración del polímero. Interacciones iónicas con el PMVEMA-Ac pueden afectar significativamente a la viscosidad de la disolución. Las propiedades reológicas, se ven muy afectadas por los cationes divalentes y trivalentes. Estas propiedades de viscosidad tienen interés a la hora de la fabricación de las futuras nanoestructuras.

**PMVEMA-ES**: es un éster derivado del PMVEMA que se obtiene por reacción del anhídrido con el correspondiente alcohol. Cuando se neutralizan son solubles en agua mientras no lo son y se comercializan en soluciones alcohólicas. La viscosidad de este derivado de PMVEMA en agua a bajas concentraciones no presenta

cambios en la viscosidad. Únicamente se ven afectadas las disoluciones del derivado éster al añadir un neutralizador que produce un incremento de la viscosidad conforme aumenta la cantidad del agente neutralizante. Dentro de los derivados esterificados se encuentra disponibles comercialmente el monoéster etílico y el butiléster. El monoéster empleado en este trabajo posee una temperatura vítrea de 102 °C y una polidispersión entre 2,5 y 3 con un peso molecular de 130 kg/mol medido por dispersión de luz y comercializado bajo una disolución etanólica al 50% p/p.

En medio acuoso, el PMVEMA puede reaccionar espontáneamente con moléculas que contengan grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>), dando como resultado la formación de enlaces amida estables. Esta reacción puede ser muy útil para modificar la superficie de la matriz del copolímero y, así, modificar sus características fisicoquímicas afectando a su estabilidad y fuerza mecánica, así como a sus propiedades farmacéuticas (distribución del fármaco, potencial bioadhesivo y tasa de liberación). El producto resultante presenta una gran solubilidad acuosa y no es capaz de reaccionar con grupos nucleofílicos<sup>37</sup>.

Este polianhidrido está aprobado por la FDA para su uso en productos comerciales de higiene bucal en determinadas formas farmacéuticas de liberación controlada y como adyuvante en parches transdérmicos. En la industria se han utilizado estos copolímeros sintéticos de PMVEMA como agentes espesantes, floculantes, adhesivos dentales<sup>38</sup>, excipientes en comprimidos bucales<sup>33</sup>, parches transdérmicos<sup>39</sup> y para la formación de nanoestructuras.



**Figura 2:** Esquema sintético de algunos derivados del PMVEMA.

El uso de éstos también ha sido descrito para realizar liberación controlada de fármacos<sup>40</sup>. Estos sistemas son capaces de retener sustancias biológicamente activas por diversos mecanismos como son<sup>37</sup>:

1. La disolución o atrapamiento dentro de la estructura macromolecular o matriz.
2. La unión covalente del fármaco con los grupos anhídrido del polímero.
3. Procesos de adsorción mediados por enlaces débiles.

Todas estas cualidades les hacen unos prometedores polímeros para ser empleados en nuevas aplicaciones a escala nanométrica.



### 3. Polímeros señalizadores

En el siglo XXI, uno de los grandes logros ha sido conseguir unir distintas áreas de la ciencia como son la física, la química y la biología entorno al mundo nano creando la nanobiotecnología. La nanobiotecnología posee un gran potencial y presenta ciertas aplicaciones que han cobrado gran importancia como son la transferencia de fármacos y la terapia génica. En este contexto, los sistemas nanotecnológicos ofrecen la posibilidad de producir nanoestructuras multifuncionales que actúan como nuevos biomarcadores y biosensores. Particularmente, es remarcable el incremento de nuevos materiales poliméricos fluorescentes debido a la cantidad de ventajas que ofrecen, superiores en algunos aspectos a cualquier otro tipo de producto, debido a que poseen una elevada sensibilidad, un rango de longitudes de onda bastante amplio, son capaces de producir detecciones de la medida de fluorescencia a tiempo real de manera fácil y sencilla y son biocompatibles. Uno de los máximos exponentes de los polímeros fluorescentes son los polímeros conjugados con esta propiedad que los hace atractivos por tener un efecto multiplicador muy interesante para explotar en aplicaciones biológicas.

Los polímeros conjugados son macromoléculas basadas en carbonos compuestas por unidades monoméricas repetidas formando una cadena principal. Su característica fundamental es su sistema  $\pi$ -extendido donde hay una deslocalización de electrones debido a un solapamiento de orbitales a lo largo de un gran número de unidades monoméricas. Esto origina materiales de baja dimensionalidad con una conductividad fuertemente anisotrópica, siendo la dirección de

máxima conductividad coincidente con la dirección de la cadena conjugada.

Todos ellos presentan una baja solubilidad en disolventes polares por lo que es un inconveniente en su procesabilidad. Las estrategias sintéticas que normalmente se adoptan para su mejora de solubilidad es la que se alcanza del modo más simple, claro y eficiente posible. Entre las dos metodologías más empleadas se encuentran:

- 1) La síntesis de nuevos monómeros, posible gracias a la gran cantidad de métodos desarrollados para obtener moléculas discretas.
- 2) La transformación de un polímero que contenga un grupo funcional susceptible de cambio, manteniendo ciertas propiedades macromoleculares inalteradas en el polímero final.

En ese sentido, muchas de las reacciones de derivatización persiguen mejorar la solubilidad de la cadena polimérica en medios acuosos para aplicaciones biológicas y, por tanto, las cadenas laterales se transforman por grupos colgantes más polares como pueden ser carbohidratos o grupos de carácter iónico tipo carboxilatos, sulfonatos, fosfatos y amonio dando lugar a los llamados **polielectrolitos conjugados (PCs) (CPEs, del inglés *conjugated polyelectrolites*)**. Estas cadenas laterales iónicas facilitan la solubilización del polímero y favorece interacciones electrostáticas con especies que contengan cargas opuestas, lo que posee gran interés biológico y ambiental<sup>41-50</sup>. A pesar de los esfuerzos realizados en síntesis para aumentar esta propiedad de solubilidad, los polielectrolitos obtenidos presentan gran tendencia a agregarse en

medio acuoso. No forman una verdadera disolución, sino una dispersión meta-estable en agua<sup>51-57</sup>.

Los PCs poseen una absorción intensa en la región del UV-visible, así como una alta fluorescencia en el estado excitado<sup>51,58</sup>. También, en su mayoría, muestran superdesactivación de la fluorescencia al asociarse con iones de carga opuesta por una combinación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, de forma que los iones actúan como desactivadores de la fluorescencia mediante procesos de transferencia de energía o de electrones.

En esta tesis doctoral, y dentro de los PCs, se ha focalizado en los copolímeros de fluorenos como los polielectrolitos marcadores o señalizadores debido a sus sorprendentes propiedades luminiscentes.

Los polifluorenos son polímeros conjugados basados en anillos de fluoreno que tienen la ventaja de poseer una gran fluorescencia, fotoestabilidad y una excelente estabilidad térmica y química frente a agentes oxidantes. Estos copolímeros de fluoreno presentan la capacidad de poder introducir fácilmente grupos en posición C9, lo que permite una mejora de la solubilidad en disolventes orgánicos. Además, al introducir cadenas alquílicas de más de seis carbonos contribuye a que no se formen agregados y mejora la procesabilidad de estos polímeros.

Las propiedades más significativas de los copolímeros derivados del fluoreno es que emiten generalmente en el azul, aunque también pueden hacerlo en un rango amplio del espectro visible que va hasta el rojo en función del anillo que acompaña al fluoreno en la unidad monomérica<sup>59</sup>. Por otra parte, como se ha comentado en líneas anteriores, otra importante característica de los polifluorenos, y en general de los polímeros conjugados, que se presenta como inconveniente a la hora de trabajar con este tipo de polímeros, es su

baja solubilidad, sobre todo en medios acuosos. Para variar la solubilidad Wang y col.<sup>60,61</sup> validaron que los polifluorenos con grupos amonio cargados en las posiciones finales de las cadenas laterales son solubles en agua, previamente referenciada por Mallavia y col.<sup>62</sup>.

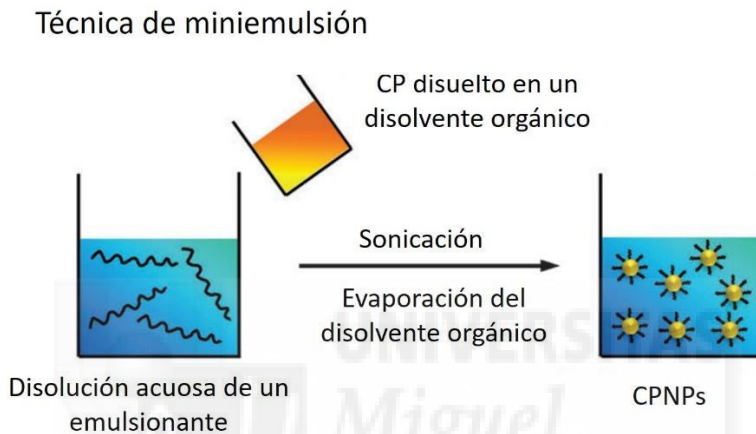
A pesar de las modificaciones químicas, la naturaleza hidrofóbica de la cadena principal es decisiva al tratar de solubilizar estos materiales en medios acuosos y su aplicación en el campo de la biomedicina. Por todo ello, se ha puesto el foco en la búsqueda de estrategias para solubilizar estos polielectrolitos en medios acuosos.

En medio acuoso los grupos polares se orientan hacia el disolvente y en disolventes orgánicos es el esqueleto polimérico el que se orienta hacia el disolvente. La adición de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos reduce la formación de agregados y produce un estrechamiento de los espectros de emisión y absorción, así como un aumento de la intensidad y desplazamiento hacia la zona del espectro del azul de la fluorescencia<sup>56</sup>.

Otra técnica para mejorar la solubilidad de polielectrolitos conjugados es incorporar tensioactivos<sup>63-66</sup>. Estos aditivos forman micelas en agua en las que se puede incorporar el polímero mejorando de esta forma su solubilidad, estabilidad y fluorescencia. Esta adición puede producir diferentes efectos en las propiedades ópticas del polímero desde la estabilización de la emisión hasta la desactivación de ésta.

Una estrategia generalmente muy utilizada para solubilizar todo tipo de polímeros es la formación de nanopartículas poliméricas (NPs). Las dos técnicas más utilizadas son la miniemulsión y la reprecipitación.

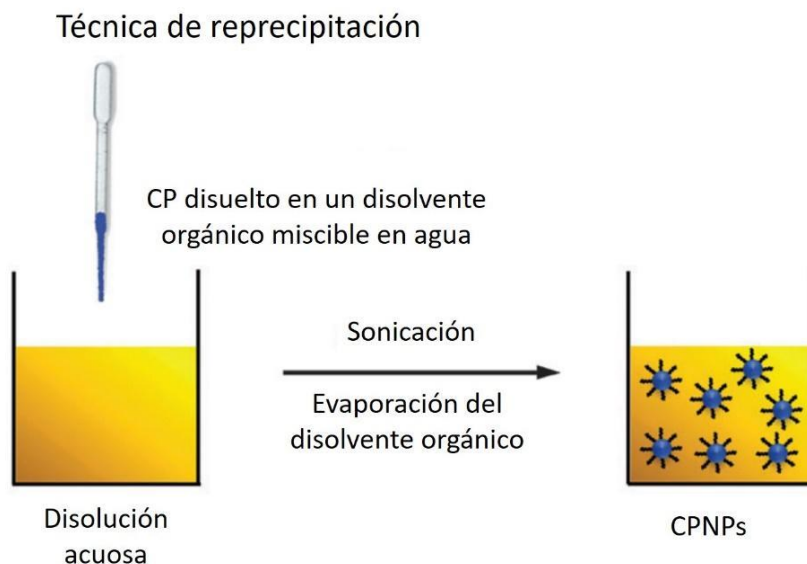
- La técnica de miniemulsión consiste en disolver el copolímero en un disolvente orgánico inmiscible en agua y añadir esta disolución a una solución acuosa con algún emulsionante bajo sonicación. Se agita energicamente hasta formar una emulsión estable. Posteriormente, se evapora el disolvente orgánico obteniendo una dispersión estable del CP en la solución acuosa.



**Figura 3.** Técnica de preparación de NPs por miniemulsión<sup>67</sup>

- La técnica de reprecipitación consiste en preparar una disolución muy diluida del copolímero hidrofóbico en un disolvente miscible en agua. Esta disolución se añade a un exceso de agua, se sonica y se agita. Posteriormente, se evapora el disolvente orgánico obteniendo una dispersión estable del copolímero en agua.

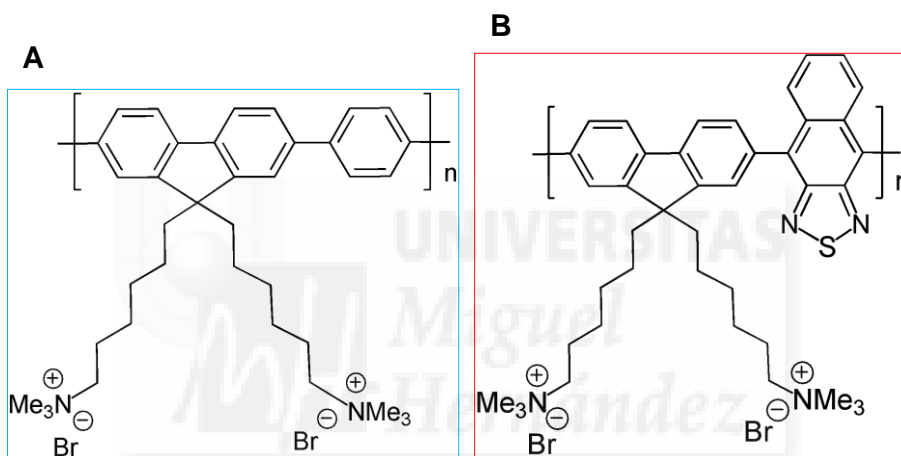
Generalmente, con el método de la reprecipitación se obtienen nanopartículas de menor tamaño y no requiere el uso de tensioactivos.



**Figura 4.** Técnica de preparación de NPs por reprecipitación<sup>67</sup>.

El problema asociado a esta estrategia es que las nanopartículas pueden unirse de forma inespecífica a multitud de moléculas biológicas. Por este motivo se están investigando otras estrategias para la solubilización de los copolímeros de fluoreno. Los procedimientos para mejorar la solubilidad y evitar este problema se centran en la encapsulación de las nanopartículas de polifluorenos dentro de otras nanoestructuras tales como liposomas, ciclodextrinas, NPs de otros polímeros biocompatibles, NPs de sílice, NPs magnéticas o NPs de oro o plata.

En esta tesis, los polímeros fluorescentes que se van a incorporar en las nanopartículas poliméricas serán polielectrolitos basados en fluoreno, diseñados y sintetizados en nuestro laboratorio: bromuro de poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-fluoreno-*alt*-1,4-fenileno} (PFP<sup>+</sup>) y bromuro de poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo)-2,7-fluoreno-*alt*-naftaleno[2,3c]-1,2,5-tiadiazol} (PFNT<sup>+</sup>).



**Figura 5:** Estructura química de los polielectrolitos.

A) PFP<sup>+</sup>. B) PFNT<sup>+</sup>.

EL PFP<sup>+</sup> es un copolímero catiónico que contiene un grupo fenilo en el anillo de fluoreno cuya unidad repetitiva se muestra en la figura 4. Sus cadenas alquílicas laterales poseen aminas cuaternarias cargadas positivamente<sup>62</sup>. Presenta unas propiedades de absorción y fluorescencia que dependen de su conformación y estado de agregación. En agua, presenta baja fluorescencia y se encuentra muy agregado con cadenas que se unen formando un núcleo cilíndrico interior. Sin embargo, al añadir tensioactivos, estos agregados se

rompen y permite obtener una mayor fluorescencia y un cambio en el espectro de emisión azul<sup>44,64,68</sup>. Es un gran candidato de transferencia de energía para aceptores sobre una gran parte del espectro visible debido a su alto rendimiento cuántico fluorescente y emisión en la banda del espectro del azul. Además, también se ha observado que presenta características para ser un adecuado aceptor de energía de residuos de triptófano en péptido y proteínas<sup>69,70</sup>. Finalmente, el PFP<sup>+</sup> es un donador de electrones y esta propiedad puede ser utilizada para aplicaciones de detección y señalización.

Por otra parte, el PFNT<sup>+</sup> es otro polímero catiónico pero que emite en la banda del rojo e incorpora un anillo de naftaleno en lugar del benceno del PFP<sup>+</sup>. Este nuevo cromóforo aumenta la emisión batocrómica; es decir, se desplaza la absorción a longitudes de onda de menor energía (hacia el rojo). Este polielectrolito también se presenta en forma de agregados en medios acuosos por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales y, por tanto, también disminuye la fluorescencia comparándola con el producto en disolventes orgánicos y otros medios.

Ambos polielectrolitos han evolucionado con diversas aplicaciones y, dado que la síntesis de PFP<sup>+</sup> se realizó con anterioridad a PFNT<sup>+</sup>, éste se ha experimentado en más ámbitos. El PFP<sup>+</sup>, entre otras utilidades, se ha empleado como sistemas de aplicaciones de detección de iones metálicos, recolección de luz artificial y transporte de carga<sup>71</sup>, como marcador fluorescente de membranas<sup>72</sup> y en interacciones con bases de DNA y RNA<sup>73</sup>. Posteriormente se publicó la síntesis y aplicaciones del PFNT<sup>+</sup> el pasado año<sup>74</sup>.

Los polímeros modificados han sido empleados como sistemas de seguimiento y liberación controlada como transportadores en micro- y macro-escala debido a su potencial funcionalización, que



impacta en las propiedades fisicoquímicas y biológicas tales como hidrofobicidad o hidrofilia, estabilidad, bioadhesión e internalización celular.

Los PCs presentan una amplia variedad de aplicaciones. Dejando a un lado las destinadas a tecnologías (diodos emisores de luz) que están apartados del ámbito biológico, estos polímeros conjugados fluorescentes han participado en diversos campos:

I) Biodetección: adquiriendo mucha relevancia en este sentido los biosensores. Numerosos sistemas basados en estos polielectrolitos han sido desarrollados para varios analitos, incluyendo iones metálicos, biomoléculas, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos<sup>41,45,75,76</sup>.

Por lo general, los sistemas de sensores basados en PCs, trabajan con lo que se denomina mecanismo *turn-on* o *turn-off*. Este sistema, *turn-on*, consiste que inicialmente la fluorescencia del polielectrolito está disminuida y la adición del analito hace que la fluorescencia se reactive, justo lo contrario del mecanismo *turn-off*.

Muchos de los sensores con PCs también utilizan el mecanismo de desactivación de la fluorescencia como herramienta de trabajo para analizar la presencia del analito y utilizan uno de los siguientes mecanismos de quencheo: transferencia fotoinducida de electrones, transferencia de energía Förster o cambio conformacional<sup>77</sup>.

II) Sondas químicas o biológicas: ello requiere que los polímeros sean solubles en agua. Por ello, los PCs son más utilizados en esta técnica, ya que como se ha comentado anteriormente, son más solubles en agua y disolventes polares que los polímeros neutros<sup>50,78</sup>.

III) Sondas para la detección de iones, biomoléculas pequeñas, proteínas, polinucleótidos y ácidos nucleicos (ARN y ADN)<sup>79-81</sup>.

IV) Marcadores fluorescentes; hoy día la evolución de nuevos señalizadores fluorescentes con gran sensibilidad sobre imágenes celulares y procesos fisiológicos está adquiriendo gran interés en aplicaciones como diagnóstico clínico, identificación de células cancerígenas, detección de contaminación/infección bacteriana, técnicas inmunofluorescentes y monitorización de sistemas de liberación a través de membranas o citoplasma<sup>82-84</sup>.

Los PCs son biocompatibles y biodegradables, y poseen cadenas laterales fáciles de manejar para la bioconjugación. Además, sus propiedades fotofísicas pueden personalizarse de manera factible mediante modificaciones de cadena principal y lateral. Si a estos PCs se les añaden elementos reconocibles, pueden ser utilizados como señalizadores ya que pueden acumularse en regiones específicas del organismo (tumores, zonas inflamadas, etc.) sin causar riesgo para la viabilidad celular<sup>42,47,85-87</sup>.

Muchos principios activos, nanopartículas y marcadores fluorescentes utilizados en la toma de imágenes celulares, interactúan primero con las células a través de su membrana. Las interacciones a nivel molecular de una partícula extracelular con la membrana plasmática requieren de una evaluación para ver su potencial de actividad. En este sentido, precursores de modelos lipídicos de membrana se han desarrollado porque imitan las membranas celulares para el estudio de las interacciones y así poder desarrollar aplicaciones biotecnológicas<sup>88</sup>. Otros autores tales como, Ngo y Cosa<sup>89</sup> caracterizaron el complejo polimérico-vesículas en la interacción entre vesículas lipídicas con PCs de carga negativa y

potenciaron las aplicaciones como sistemas de detección. Las concentraciones requeridas de polímero para esta última aplicación, son muchos mayores que las utilizadas para la detección por interacción del polímero con las membranas<sup>89,90</sup>.

Con estos precedentes, para elaborar la presente tesis doctoral y realizar las nanoestructuras propuestas se eligieron los derivados de copolímeros sintéticos con posibilidad de transformarse en aniónicos y de alto carácter hidrófilo, en combinación con los polielectrolitos conjugados de carácter catiónico desarrollados en nuestro laboratorio. Con estas características iónicas se prevé que interaccionen de forma electrostática y sirva para desarrollar nuevas formas farmacéuticas y sus posibles aplicaciones.

A pesar de la dificultad del desafío, la aparición de potenciales beneficiosos en nanobiotecnología parece una meta que vale la pena explorar.

Partiendo de estas premisas, en esta tesis doctoral se proyecta el desarrollo de nuevos sistemas nanoestructurados basados en ciencia de polímeros con fines terapéuticos y de diagnóstico, empleando la nanotecnología como herramienta de diseño. Para ello, se propuso el desarrollo de dos tipos de nanoestructuras: nanopartículas y nanofibras realizadas con el mismo polímero base de origen comercial (“*carrier*” o transportador) y con otros polielectrolitos sintetizados en nuestro laboratorio con propiedades luminiscentes singulares (señalizador). Con estos sistemas formulados se pretende obtener un aumento de la estabilidad de los materiales y almacenamiento del medicamento, proteger el material encapsulado de la inactivación química, enzimática o inmunológica, controlar la liberación del fármaco y diseñar nanoestructuras fluorescentes con

propiedades fotoestables y biocompatibles que presente selectividad frente a la aplicación prevista.

Esta tesis doctoral se ha dividido en cuatro capítulos que se inicia con un breve preámbulo de la motivación del trabajo, seguida de una visión y repaso de los tipos de materiales poliméricos que se han empleado para el desarrollo de las diferentes nanoestructuras, incidiendo en por qué se han seleccionado estos polímeros para las aplicaciones objeto de estudio.

El capítulo II está dirigido a enumerar y desglosar los objetivos de la presente tesis.

En el capítulo III se abordarán las formas farmacéuticas basadas en nanopartículas. Este capítulo quedará dividido, en una introducción que se fundamenta en las aplicaciones y su particularidad, seguida de los materiales y métodos, resultados y discusión comentados en detalle.

El capítulo IV quedará estructurado igual que el anterior, pero en este caso basado en las nanofibras, segunda forma farmacéutica elegida para exponer la encapsulación de fármacos. Por último, en el capítulo IV se enunciarán las conclusiones de los anteriores capítulos.



## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**



El objetivo global de esta tesis doctoral es el desarrollo de sistemas nanoestructurados mediante ciencia de polímeros en la escala nanométrica. Con estos sistemas se pretende potenciar la actividad antimicrobiana de ciertos agentes terapéuticos con polielectrolitos conjugados para administración oral o transdérmica y desarrollar un sistema transdérmico para aplicación en terapia fotodinámica.

Las nanoestructuras a utilizar serán: I) nanopartículas formadas por la unión de polímeros de diferente naturaleza y II) nanofibras poliméricas fabricadas con materiales análogos a las nanopartículas pero de diferente dimensionalidad. Con el desarrollo de estos sistemas nanoestructurados también se pretende adquirir una posible herramienta de detección por bioimagen en salud humana.

Para la elaboración de los nanosistemas poliméricos se combinarán dos tipos de copolímeros atendiendo a su función:

a) derivados del copolímero comercial PMVEMA, que posee diferente reactividad según las condiciones experimentales. Lo utilizaremos como transportador y mejora de las propiedades de solubilidad del sistema final.

b) el copolímero sintético conjugado (PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>), con propiedades fluorescentes, será un polielectrolito catiónico derivado de un copolímero neutro y se utilizará como marcador o señalizador.

Para conseguir este objetivo global, el trabajo se desglosa en tres objetivos concretos:

Objetivo 1. Selección del sistema de vehiculización: transportador, señalizador y fármaco.

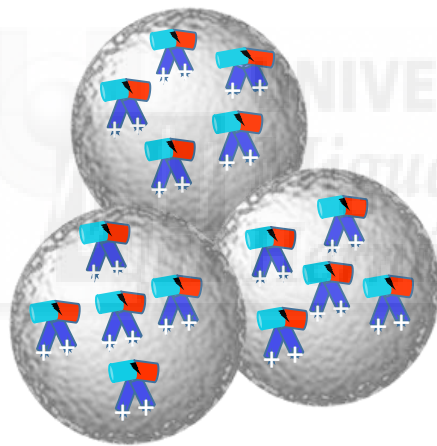
Objetivo 2. Preparación y caracterización de sistemas nanoestructurados: nanopartículas y nanofibras.

Objetivo 3. Aplicaciones biotecnológicas de las nanoestructuras en ensayos *in vitro*.

Estos objetivos están detallados por capítulos. Cada capítulo se ha confeccionado teniendo en cuenta la dimensionalidad del nanomaterial y, por tanto, en cada uno se puntualizan los hitos en cada nanoestructura, comenzando con las nanopartículas y terminando con las nanofibras: Por último, cada una de los nanosistemas ha sido dirigido a una aplicación biotecnológica específica que se han iniciado y se están desarrollando en nuestros laboratorios.

En esta tesis doctoral se pretende desarrollar nuevos sistemas nanoestructurados con aplicaciones biotecnológicas, fundamentalmente en patologías infecciosas y terapia fotodinámica. Para llevarlo a cabo se empleará la nanotecnología como herramienta de mejora de las prestaciones de los nuevos materiales a utilizar a lo largo del trabajo.





**CAPÍTULO III**  
**NANOPARTÍCULAS**



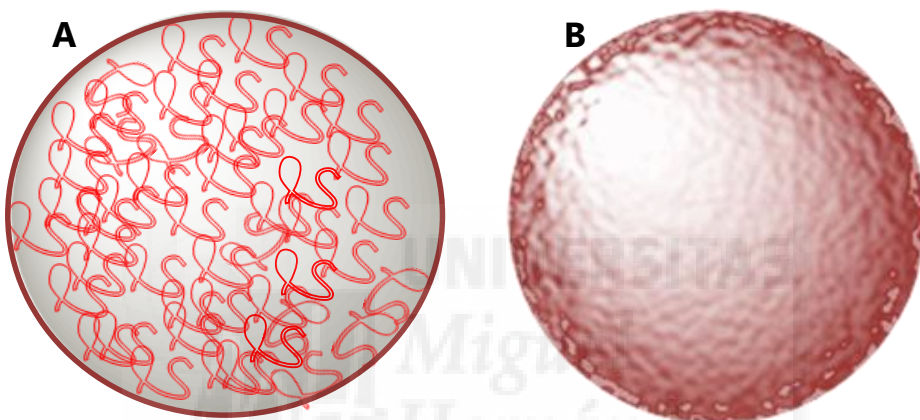


## **Introducción**



## 1. Introducción

Las nanopartículas se definen como sistemas particulares coloidales de entre 10 nm y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que pueden ser de distintos materiales, lo cual va a depender de la aplicación para la que son diseñadas y/o del método utilizado para su fabricación. Según su estructura se clasifican como: nanocápsulas (estructura vesicular) o nanoesferas (estructura matricial)<sup>91-94</sup> (figura 1).



**Figura 1: Tipos de nanopartículas.**  
A) nanocápsula. B) nanoesfera

Por una parte, las nanocápsulas son sistemas vesiculares formados por una cubierta polimérica que delimita una cavidad en cuyo interior se puede contener un compuesto de interés. Por otra parte, las nanoesferas son formas matriciales compuestas por una red tridimensional polimérica donde se encuentra disperso el compuesto de interés. En ambos casos, la sustancia puede quedar atrapada en la estructura o adherida a ella dependiendo de la estrategia de síntesis utilizada<sup>94</sup>. El encapsulamiento del compuesto de interés dentro de la nanoestructura se logra añadiéndolo durante la fabricación de las nanopartículas, mientras que la adsorción del principio activo a la superficie requiere que primero se realicen las nanopartículas y

posteriormente se incuba la molécula activa con la suspensión de estas nanoestructuras.

En cuanto a los métodos de fabricación, el que generalmente se sigue para la producción de nanocápsulas consta de dos pasos: Primero, la generación de gotas acuosas en una fase orgánica y, a continuación, la polimerización interfacial monomérica o bien la deposición de polímeros<sup>95</sup>. Por su lado, las nanoesferas se fabrican adicionando la sustancia al medio de reacción con anterioridad o al mismo tiempo que el polímero durante el proceso de generación de las nanopartículas<sup>96</sup>.

Las nanopartículas poliméricas de interés en esta tesis son las de tipo vesicular y el objeto de su estudio es realizar cápsulas con principios activos hidrófilos con actividad antimicrobiana, a la vez de incorporar un polielectrolito señalizador. Si bien las nanopartículas poliméricas se están utilizando tanto para encapsular sustancias hidrófilas como lipófilas. Las moléculas hidrofílicas presentan baja biodisponibilidad debido a poseer una degradación hidrolítica y proteolítica, además de poseer una baja permeabilidad y estabilidad y, por tanto, un tiempo de vida medio corto. Por ello, la nanomedicina en los últimos años se ha centrado en encapsular estas moléculas y dirigir las al punto de acción<sup>95</sup>.

En general, estas formas farmacéuticas aportan las siguientes ventajas:

- Protección frente a posibles degradaciones físico-químicas y/o enzimáticas.
- Posibilidad de disminuir los efectos tóxicos que son causados a veces por una administración directa de la solución<sup>95</sup>.

- Posibilidad de adhesión a la mucosa intestinal.
- Posibilidad de liberación controlada.

Normalmente, las nanopartículas están compuestas por un polímero y el principio activo. A éstas, se les pueden añadir otros excipientes en función de la finalidad de las mismas.

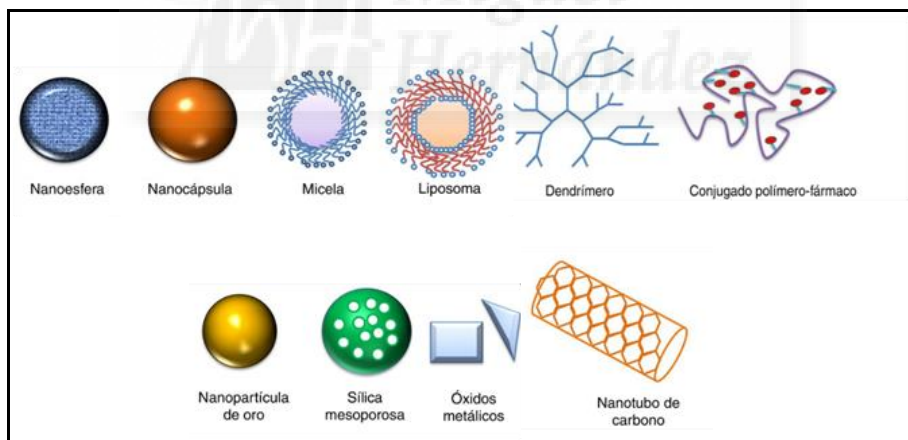
La ruta seleccionada de administración de las nanoestructuras, determina el diseño y la estructura de las nanopartículas a fabricar. Por la comodidad en la administración, seguridad de la dosificación y coste reducido las nanopartículas que se van a desarrollar en este trabajo van a ir destinadas a la vía oral, que ha sido la ruta principal de administración de fármacos para el tratamiento de muchas enfermedades. Para ello, el método de fabricación seleccionado en este proyecto es la técnica de desplazamiento de disolvente que se detallará en el siguiente apartado de este capítulo. Este método puede producir nanocápsulas o nanoesferas dependiendo de ciertos parámetros como son la introducción de volúmenes de aceites, aunque por lo general se forman nanoesferas, que es el caso que nos ocupa en este proyecto.

### **1.1. Tipos de nanopartículas**

Desde hace varios años se están realizando esfuerzos para encapsular sustancias de diferente naturaleza. Para desarrollar un sistema nanoestructurado adecuado para encapsular la sustancia deseada, hay que valorar las propiedades del analito a introducir en el interior de la estructura. Además de las propiedades que se requieren se seleccionará el material adecuado con el que se va a realizar la nanoestructura.

A lo largo de los años se han ido desarrollando diversos nanomateriales que se pueden clasificar en cuatro bloques:

1. Materiales realizados a base de carbón: Sus propiedades más destacadas son su bajo peso y alta dureza, su elasticidad y su conductividad eléctrica.
2. Materiales metálicos entre los que se encuentran los *quantums dots*, nanopartículas de oro, plata o de metales reactivos como el dióxido de titanio, entre otras.
3. Dendrímeros: son polímeros nanométricos construidos como si tuviese una estructura tipo árbol que van creciendo de unas ramas otras y así sucesivamente.
4. Composites: combinaciones de diferentes nanopartículas o con materiales de mayor tamaño.



**Figura 2: Esquema de diferentes nanoestructuras.**

orgánicas (arriba) inorgánicas (abajo)<sup>97</sup>.

Si se centra la visión en la estructura química de los transportadores, pueden desarrollarse nanopartículas orgánicas e



inorgánicas y nanopartículas biodegradables tanto naturales como sintéticas<sup>98</sup>.

Dentro de las partículas inorgánicas se encuentran: las partículas de fosfato cálcico, de sílice, de oro, magnéticas, *quantum dots* (óxidos metálicos) y los nanotubos de carbono. Las orgánicas quedan seleccionadas como lípidos catiónicos, nanoemulsiones lipídicas, nanopartículas sólidas de lípidos y transportadores poliméricos entre los que se encuentran como se ha descrito anteriormente polímeros naturales y sintéticos.

A continuación, se describen algunos de los tipos de nanopartículas mencionadas:

#### Nanopartículas de sílice

Las nanopartículas de sílice han sido muy empleadas dada la baja toxicidad que posee, pero tienen la desventaja de presentar interacción con las proteínas del suero y por tanto disminuir así su eficacia de liberación.

#### Nanopartículas magnéticas

Son partículas que poseen un núcleo metálico y, por tanto, las hace susceptibles de ser atraídas por un imán. Este tipo de nanopartículas se suelen recubrir según la funcionalidad que se desee para que su biocompatibilidad sea apta según el tipo celular. Su desventaja más remarcable es la imposibilidad en algunos tejidos de poner un campo magnético fuerte para ser atraídas y que tienden a la aglomeración<sup>98</sup>. Otro problema que tiene este tipo de nanopartículas es que solamente son solubles en disolventes orgánicos y para evitar esto se debe realizar una co-precipitación en medio acuoso alcalino<sup>99</sup>.

A pesar de estos inconvenientes, este tipo de nanopartículas está adquiriendo gran interés en aplicaciones biomédicas tales como el diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades además de ser utilizadas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

### Nanopartículas metálicas

Se trata de partículas con un núcleo de oro o plata que absorben luz en la región cercana a la luz infrarroja. Poseen una elaboración sencilla y una toxicidad relativamente baja, aunque debido a la estabilidad química de estos núcleos, es complicado disolver su recubrimiento dentro de la célula<sup>98</sup>.

Las nanopartículas de plata, en las últimas décadas, han tomado interés en nanociencia por sus propiedades químicas, físicas, ópticas y biológicas que le dan capacidad para diversas aplicaciones industriales, químicas y médicas. Estas nanopartículas poseen capacidad antifúngica, antibacteriana y antiviral pero siempre teniendo en cuenta su toxicidad. Para la formación de nanopartículas de plata se encuentran diversos métodos, aunque predominan los de reducción química<sup>100</sup>.

Las nanopartículas de oro, han tomado importancia en el campo de la nanobiotecnología por sus posibles aplicaciones. Tienen diversas diligencias, pero por su propiedad física única de localizarse en la superficie de resonancia plasmódica las hace de interés para dispositivos electrónicos y fotónicos y como amplificadores de traductores de señales<sup>101</sup>.

### Quantum dots

Son nanopartículas realizadas por moléculas semiconductoras inorgánicas de óxidos de CdSe, CdS, CdTe, ZnS, PbS, etc. Pueden contener de 100 a 100.000 átomos y con un diámetro total entre 2 y 10 nm. Su mayor desventaja es la baja estabilidad coloidal que muestran estas moléculas en suspensión y su bioacumulación tanto en tejidos como en órganos cuando su tamaño supera los 5 nm<sup>98</sup>.

### Poliméricas

La nanopartículas poliméricas, también llamadas convencionales, se definen como sistemas particulares que, según su estructura, se denominan nanocápsulas o nanoesferas ya descrito previamente. Se realizan con una técnica escogida y con un polímero seleccionado. Dentro de las nanopartículas poliméricas podemos encontrar las que poseen propiedades bioadhesivas, que en el caso que nos ocupa el polímero transportador tiene esta propiedad.

Las NPs bioadhesivas, son partículas poliméricas realizadas con materiales con capacidad de adherirse a los tejidos del organismo por un tiempo prolongado. Según el tipo de material que se adiciona al polímero tenderá a pegarse a ciertos órganos o a otros. Si además se le añaden sustancias específicas con una diana de acción determinada, irán directamente al sitio indicado.

La bioadhesión puede definirse como la capacidad de un material, sintético o natural, de adherirse a los tejidos del organismo por un periodo de tiempo relativamente prolongado<sup>102</sup>. El fenómeno de bioadhesión cobra una gran importancia en el área de la tecnología farmacéutica, pues al incorporarse a diversas formas farmacéuticas ocasiona un incremento del tiempo de permanencia del fármaco en el lugar de absorción, aumentando así su eficacia. En el caso de sistemas bioadhesivos para el transporte de fármacos, el término

bioadhesión se emplea para describir la adhesión entre polímero y tejido.

## 1.2. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

Durante muchos años se está intentando encapsular diversas sustancias tanto lipofílicas como hidrofílicas. Para llevar a cabo estas encapsulaciones hay una gran posibilidad de métodos. Dependiendo de la naturaleza de la sustancia a encapsular es posible seleccionar el método más adecuado en función del polímero seleccionado.

Los métodos de fabricación se pueden dividir en dos grandes grupos y éstos a su vez en subgrupos:

1. Polimerización de monómeros
  - 1.a. Polimerización por emulsión
  - 1.b. Polimerización interfacial.
2. Dispersión del polímero
  - 2.a. Evaporación del disolvente por emulsificación
  - 2.b. Método del desplazamiento de disolvente y disposición interfacial.
  - 2.c. Difusión o emulsión del disolvente.
  - 2.d. *Salting out* con polímeros sintéticos.

La mayor diferencia entre los métodos de polimerización de monómeros y los de dispersión del polímero radica en el uso de polímeros generalmente no biodegradables o muy poco biodegradables en la polimerización. Además, en estos métodos se

generan normalmente moléculas residuales más o menos tóxicas que requieren métodos de purificación rigurosos. Por estos inconvenientes en ciencia de la salud se proponen los métodos de dispersión de polímeros ya sintetizados<sup>95,103</sup>.

## **1. Métodos de nanoencapsulación por polimerización de monómeros**

### **1.a. Polimerización por emulsión**

Dentro de este método de fabricación se puede distinguir entre el método y fase continua orgánica y el método de fase continua acuosa. La diferencia entre ellos, es que el de fase continua orgánica utiliza tensioactivos o polímeros solubles que protejan de las agregaciones en momentos iniciales del proceso mientras que el método de fase continua acuosa no los necesita en ninguna fase del proceso.

### **1.b. Polimerización interfacial**

En este método las nanocápsulas se forman espontáneamente por polimerización después del contacto del polímero con los iones presentes en el agua. Lo primero es disolver el polímero a utilizar en una mezcla de aceite y disolvente orgánico y posteriormente esta mezcla se hace extruir por una aguja y caerá a una solución acuosa en agitación con o sin etanol.

La eficacia de encapsulación es superior que, para la polimerización por emulsión, pero su inconveniente es el uso de disolventes orgánicos en la fase externa.

## 2. Métodos de nanoencapsulación por dispersión del polímero

### 2.a. Evaporación del disolvente por emulsificación

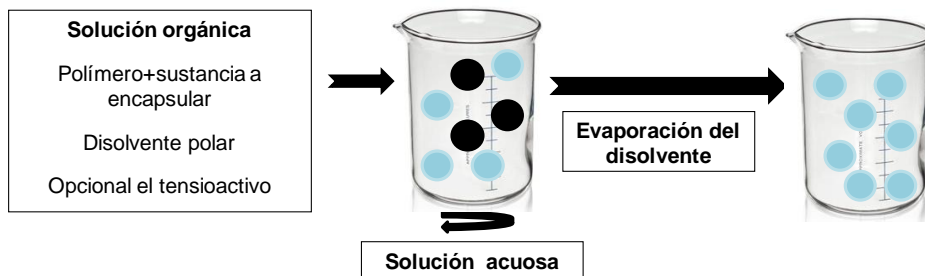
Este proceso de fabricación requiere en una primera etapa la emulsificación de la solución polimérica en la fase acuosa y así, en la segunda etapa se realiza la evaporación del disolvente y consecuente precipitación como nanoesferas.

Este método sólo puede aplicarse a sustancias lipófilas debido a la alta energía requerida en la homogenización.

### 2.b. Método del desplazamiento de disolvente y disposición interfacial

Ambos métodos se comentan al mismo tiempo por su parecido en la elaboración. Ambos se basan en una emulsificación espontánea entre la fase interna orgánica donde se encuentra el polímero dentro de la fase externa acuosa (figura 3).

El método de la disposición interfacial únicamente forma nanocápsulas y el método de producción por desplazamiento de disolvente puede formar tanto nanoesferas como nanocápsulas. Ello es debido al instante en el que se forman las nanopartículas que dependerá de cómo se introduce el polímero. En el método del desplazamiento de disolvente tiene un paso que es la precipitación del polímero desde la fase orgánica y la difusión del disolvente orgánico en el medio acuoso en presencia o no de un tensioactivo. La disposición del polímero en la interfase entre el disolvente orgánico y el agua, causa una rápida difusión del disolvente permitiendo la formación instantánea de una suspensión coloidal. Generalmente se forman nanoesferas, salvo en el caso de utilizar un volumen pequeño de aceite no tóxico en la fase orgánica que nos daría la formación de nanocápsulas.



**Figura 3:** Esquema de la técnica de desplazamiento de disolvente

Sin embargo, en la técnica de deposición interfacial, el polímero se disuelve junto a la sustancia a encapsular en una mezcla de disolventes y ésta se introduce lentamente en una solución acuosa en agitación, quedando el polímero en la interfase entre el agua y la mezcla de disolventes formando nanocápsulas.

### 2.c. Difusión o emulsión del disolvente

Para realizar la encapsulación, esta técnica, disuelve el polímero en un disolvente miscible con el agua y, posteriormente, se añade agua hasta saturarlo para asegurar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. Una vez el disolvente orgánico está miscible con el agua se produce la precipitación del polímero y formación de nanopartículas. Se pueden producir tanto nanocapsulas como nanoesferas dependiendo de la relación entre el aceite y el polímero.

Las ventajas que presenta esta técnica es su alta eficacia de encapsulación, aunque al eliminar grandes volúmenes de agua de la suspensión reduce esta eficacia. Este método es adecuado para sustancias lipófilas.

### 2.d. "Salting out" con polímeros sintéticos.

El método "salting out" (precipitación o expulsión salina) se basa en la separación de un disolvente miscible con el agua de una solución acuosa aprovechando el fenómeno físico químico basado en

las interacciones de electrolitos (cloruro de magnesio, cloruro de calcio...) con no electrolitos según la cual a mayor fuerza iónica algunos polímeros precipitan debido a las interacciones hidrofóbicas entre ellos. Se puede considerar este método como una modificación del anterior. Esta técnica posee la desventaja de poder encapsular únicamente sustancias de carácter lipófilo.

Otro método de clasificar las nanopartículas, y citado al inicio de este capítulo, es atendiendo a la estructura de las nanopartículas y según se disponga el principio activo en ellas. En la siguiente tabla se pueden observar las diferentes ventajas e inconvenientes de las diversas técnicas de encapsulación.





**Tabla 1:** Ventajas e inconvenientes de las técnicas de encapsulación en nanopartículas poliméricas.

<b>Técnica encapsulación</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
<b>Fármaco en una matriz polimérica.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Protección del pa*.</li> <li>-Liberación controlada.</li> <li>-Eficacia de encapsulación dependiente del proceso de formulación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Falta de solubilidad del pa en el polímero.</li> <li>-Reacción entre el pa y el polímero.</li> <li>-Uso de disolventes orgánicos.</li> <li>-Acidificación del medio durante la degradación del poliéster.</li> </ul>
<b>Adsorción a la membrana polimérica.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pa no sometido al proceso de formulación.</li> <li>-La naturaleza del polímero influirá en la carga del pa.</li> <li>-No hay reacción entre el pa y el polímero. Posibilidad de modificación de la superficie de la nanopartícula.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Liberación rápida del pa.</li> <li>-Desestabilización de la nanopartícula por cargas.</li> <li>-Modificación de algunas propiedades.</li> <li>-Baja eficacia biológica</li> <li>-Uso de disolventes orgánicos.</li> </ul>
<b>Nanocápsulas con núcleo acuoso.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Protección del pa.</li> <li>-Solubilidad del pa en el núcleo.</li> <li>Liberación controlada del pa.</li> <li>-La reacción entre el pa y el monómero está limitada.</li> <li>-Bajo contenido de polímero.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Uso de dispositivos de alta energía para producir emulsiones o nanoemulsiones.</li> <li>-Disolventes orgánicos.</li> </ul>

\*pa = principio activo

### 1.3 Aplicaciones de las nanopartículas

Las nanoestructuras que nos ocupan este capítulo cada vez tienen un rango de actuación mayor, pudiéndose aplicar desde campos agroalimentarios, medios ambientales, ingenieriles y lo que nos interesa en esta tesis doctoral que es el campo de la nanomedicina. La nanomedicina es la aplicación médica de la nanotecnología molecular y se ha pensado como el progreso de la terapia en humanos para conseguir mejora de la salud a escala molecular. Este campo de la medicina, en la última década, está sufriendo un gran desarrollo a lo largo de todo el mundo gracias al conjunto de nuevas tecnologías como la de polímeros a escala nanométrica y la biotecnología.

Por otra parte, el avance en esta tecnología nos ha llevado a otros campos como es el del acondicionamiento, energía solar y automoción. En esos sectores se utilizan nanopartículas de materiales poliméricos para poder elaborar nanocompuestos o nanocoberturas con especial interés en acondicionamiento de comida y cosmética, energía solar (especialmente en la orgánica fotovoltaica) y en ciertas partes de la automoción. En energía solar contribuyen en la realización de paneles solares, placas fotoactivas y protectoras o simplemente intervienen en la superficie de los paneles solares. En el campo de la automoción se utilizan con fines mecánicos, electrónicos y aislamiento térmico, ofertando resistencia al desgaste y retraso en la llama. Y por último, si ponemos la vista en el acondicionamiento alimentario y cosmético, los nanocompuestos realizados con nanopartículas tienen interés dado su poder de formar barreras para los gases y por sus propiedades antimicrobianas<sup>104</sup>.

Entre las principales aplicaciones de las nanopartículas al principio de los estudios se encuentra el tratamiento de enfermedades

respiratorias como el asma bronquial, los desórdenes genéticos de las vías respiratorias (fibrosis quística), las enfermedades infecciosas y el cáncer de pulmón. Incluso se han utilizado estos vectores administrados por vía respiratoria como sistemas de vacunación<sup>105</sup>. Otra importante aplicación la constituye el tratamiento de las enfermedades hepáticas, tanto de la hepatitis B como de la hepatitis C, en las que se administra al paciente nanopartículas cargadas con interferón y diversos antivirales<sup>106</sup>. Hoy día, se encuentran diversos tipos de fármacos encapsulados que abarcan desde anticancerígenos<sup>107</sup> hasta antimicrobianos, pasando por diferentes sustancias encapsuladas como son antifúngicos<sup>94</sup> y algún tipo de virus<sup>108</sup>.

El uso de la nanobiotecnología en medicina, sobre todo para la liberación de fármacos, está adquiriendo mucho auge, sin dejar de lado otras aplicaciones importantes en ingeniería genética, imágenes tecnológicas como pueden ser *in vivo* o diagnóstico *in vitro*, diferentes terapias e ingeniería de tejidos. Por otra parte, las nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono y otros están tomando importancia en el sector del marcaje de dianas por mecanismos poco o nada invasivos y tener un buen diagnóstico sobre todo en enfermedades como el cáncer<sup>109</sup>.

Por último, cabe destacar el uso de las nanopartículas en el campo de la detección e identificación de patógenos en muestras biológicas<sup>110,111</sup> y las nanopartículas magnéticas como nuevos métodos de diagnóstico en medicina<sup>112</sup>.

Con todos los nuevos avances se está mejorando y progresando en nuevos tratamientos para diferentes terapias incluyendo el cáncer, mejora en tratamientos ya convencionales, actividades antimicrobianas y medicina regenerativa.

#### 1.4. Bacterias

Los seres vivos han tenido diversas clasificaciones a lo largo de la historia, pero actualmente la clasificación de Carl Woese de 1990 basada en el análisis filogenético del ARN ribosómico 16S presenta la existencia de tres dominios: archaea, bacteria y eucarya. Los dos primeros dominios quedan dentro del tipo celular procariota y el tercero dentro de los eucariotas. En el dominio bacteria se engloban las bacterias patógenas humanas que en su mayoría se ubican dentro de las Eubacterias que son seres procariotas y unicelulares. Este dominio se divide en 12 reinos entre los que se encuentran las bacterias Gram positivas y las Gram negativas.

Para que un microorganismo se considere agente causal de una enfermedad según R. Koch, debe cumplir los siguientes postulados:

1. Encontrarse en todos los casos de la enfermedad.
2. Aislarse en un cultivo puro a partir de las lesiones.
3. Reproducir la enfermedad cuando se inocula a un animal.
4. Reaislarse a partir de las lesiones producidas en el animal.
5. Opcional: inducir una respuesta inmunológica específica.

Las bacterias patógenas tienen la estructura bacteriana dividida en dos: a) Elementos constantes: membrana externa en Gram negativas, peptidoglicano, membrana citoplasmática y citoplasma, ribosoma y núcleo y, b) Elementos facultativos: cápsula, orgánulos exteriores (flagelos, fimbrias y pili), inclusiones citoplasmáticas, esporas y plásmidos.

Para valorar las diferencias entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, brevemente, se van a comentar a continuación algunos aspectos de su estructura.

La membrana externa está presente únicamente en las bacterias Gram negativas y contienen el liposacárido (con el antígeno somático O, el core y el lípido A), las porinas que son canales proteicos que permiten la entrada de nutrientes y existen diversas lipoproteínas que participan en la unión de la membrana externa al peptidoglicano.

La membrana citoplasmática o también denominada interna, es una envoltura lipoproteica constituida por un 40% de fosfolípidos y un 60% de proteínas. A diferencia de los eucariotas, no poseen esteroides, excepto los Micoplasmas. En esta membrana se desarrolla la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa ya que las bacterias no poseen mitocondrias.

Entre la membrana externa y la interna se encuentra el espacio periplásmico con las conexiones denominadas uniones de Bayer para conectar ambas membranas, que no está bien definido en las Gram positivas ya que estas membranas se encuentran muy pegadas. El peptidoglicano (PG) o mureína es un heterósido localizado por encima de la membrana interna, es una cubierta rígida que da forma y rigidez a la bacteria, y que protege en medios hipotónicos. Las bacterias Gram positivas contienen mayor porcentaje de PG que las Gram negativas, por ello la pared celular de las Gram positivas es más polar que la de Gram negativas y ello facilita la resistencia a compuestos hidrofóbicos como pueden ser las sales biliares. Los ribosomas bacterianos, están compuestos por proteínas y ARN ribosómico. Son 70s (50s+30s), suelen presentarse agrupados (polirribosomas) y su secuenciación se utiliza en filogenética bacteriana.

El último elemento constante en las bacterias es el núcleo, que carece de membrana nuclear limitante y no está asociado a histonas. Posee una única molécula circular de ADN acompañada de ARN y polimerasas.

En cuanto a los elementos facultativos de las bacterias, tenemos el glicocalix, que es la cubierta más externa, donde se realiza el reconocimiento específico de las células y posee una capa mucosa con función de adherencia. Generalmente posee composición polisacárida excepto en *Bacillus* que es proteica formada por D-glutámico. Las bacterias más clásicas que poseen cápsula y todas producen meningitis son: *Streptococcus pneumoniae* y *agalactiae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae* tipo B y *Cryptococcus neoformas*. También tiene cápsula *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* y *paratyphi C* y *Klebsiella*.

Los pili, fimbrias y flagelos tienen una composición proteica y son antigénicos. Por su parte, las inclusiones citoplasmáticas son las vacuolas (poseen función de osmolaridad), y los gránulos (almacén de energía) entre los que destacan los poli- $\beta$ -OH-butirato, polifosfatos y carboxisomas entre otros.

El último elemento facultativo, son las esporas que son formas de resistencia a cambios de temperatura, pH y nutrientes.

El tamaño bacteriano es un parámetro que está determinado genéticamente, pero para cada cepa viene influido por una serie de factores externos: medio de cultivo, edad de éste, retracción por la coloración, agentes ambientales, etc. En general, para la mayoría de las especies patógenas, oscila entre una y diez micras de longitud. En cuanto a la morfología distinguimos entre las que poseen forma esférica como son los cocos, las que tienen forma alargada, bacilos y

las que presentan forma helicoidal: espiroquetas. Los cocos se encuentran aislados, en parejas, en cadenas, en racimos o en tétradas. Los bacilos pueden ser pequeños, que es el caso de los cocobacilos. Poseer extremos redondos, rectos, afilados o curvos. Ser bacilos coriniformes o presentarse en forma de cadena.

Las nuevas tecnologías han puesto el foco de atención en las resistencias bacterianas a los antibióticos para intentar combatirlas. La resistencia bacteriana es la capacidad que posee un microorganismo de permanecer refractario a los efectos de un agente antiinfeccioso.

Existen dos grandes grupos de resistencias, las naturales o las adquiridas:

1. Naturales: el microorganismo es, desde el principio, insensible a un antibiótico por falta del sitio diana, por ser impermeable a él. Este tipo de resistencia, determina el espectro de acción de un antibiótico cuando es introducido en clínica.
2. Adquiridas: son las más frecuentes e importantes. Un microorganismo, se considera resistente cuando para conseguir alterarlo, se necesitan concentraciones de fármaco tóxicas o superiores a la concentración que este puede alcanzar en el sitio de infección.

Los mecanismos de resistencia antibacteriana pueden adquirirse por dos mecanismos: la mutación cromosómica o la adquisición de genes.

La mutación cromosómica es una resistencia cromosómica. Para que se dé es necesario administrar antibiótico para seleccionar la población resistente. Aparecen de forma espontánea y son persistentes, es decir, irreversibles y se transmiten a la descendencia. Son poco habituales, aunque algunos antibióticos las poseen como

vía principal. A destacar: **las quinolonas**, fosfomicina y rifampicina por disminución de la captación de fármaco. Y para ***Staphylococcus aureus* meticilin resistente** y ***Streptococcus pneumoniae* resistente** a betalactámicos por alteración en la diana de acción, en este caso concreto modificación de las PBPs (del inglés *penicillin binding proteins* que son proteínas de unión a la penicilina).

El segundo mecanismo de adquisición de resistencias es la adquisición por genes, que es una resistencia extracromosómica. Es la más frecuente. Tienen lugar a través de procesos de transformación, conjugación o transducción. Son resistencias reversibles. Pueden estar vehiculizadas por plásmidos conjugados (Factores R) y más raramente por plásmidos no conjugativos, adquiridos por transducción o recombinación. Estas resistencias pueden ser debidas a tolerancia al antibiótico o por destrucción (**betalactamasas** y las fosforilasas que provocan la hidrólisis de **aminoglucósidos**) o inactivación enzimática del mismo<sup>113</sup>.

Por todo lo expuesto en cuanto a la problemática de resistencias a los antibióticos y los avances en nanotecnología, se tomó la decisión de realizar formas farmacéuticas a base de nanopartículas con los antibióticos seleccionados para intentar mejorar en algún punto los tratamientos actuales y así poder disminuir resistencias, mejorar la estabilidad de fármacos y probar disminuir alguna dosis para evitar efectos adversos.

#### 1.4.1. Bacterias seleccionadas para desarrollar los ensayos

Las cepas fueron adquiridas del Hospital General de Alicante y se manipularon en las instalaciones del propio hospital, salvo la cepa *E. coli* que también se manipuló en el IBMC.



Las bacterias seleccionadas para realizar los experimentos *in vivo* del capítulo que está llevando a cabo fueron: *Escherichia coli* Top 10 F' sensible (*E. coli* sensible), *Escherichia coli* BLEE resistente (*E. coli* resistente) que es una especie productora de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SARM), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Enterococcus faecium* resistente (*E. faecium* resistente) y *Klebsiella Pneumonia* sensible y resistente (*K. pneumoniae* sensible y resistente).

Las bacterias *E. coli* sensible, son bacilos Gram negativas pertenecientes al grupo de las enterobacterias. Son unos gérmenes muy abundantes en la flora intestinal normal de los animales, pero también contaminan aguas y alimentos y sobreviven bien en el medio ambiente. *E. coli* pertenece al género de patógenos reconocidos y puede producir infecciones extrahospitalarias. Los cuadros clínicos en los que se manifiesta son digestivos y extradigestivos. Entre los externos al aparato digestivo, se pueden encontrar infecciones urinarias, meningitis, infecciones superficiales o intraabdominales y alguna sepsis y los cuadros digestivos más comunes son las diarreas.

*K. pneumoniae* son bacilos al igual que la anterior Gram negativos perteneciente también a enterobacterias pero en este caso enterobacterias oportunistas que producen infecciones nosocomiales. Los cuadros más típicos en los que están presentes son infecciones respiratorias tipo neumonía.

Las cepas de *S. aureus*, son cocos Gram positivo. Crecen en medios comunes y toleran medios con alto contenido en sal. Forma parte de la flora normal de la piel y mucosas. Los cuadros clínicos que presentan son desde infecciones cutáneas a mastitis, neumonía, endocarditis aguda, artritis-osteomielitis e infección de heridas.

Y, por último, ambas cepas de enterococos (*E. faecalis* y *E. faecium*), son cocos Gram positivos pertenecientes al género estreptococos. Son muy resistentes al medio ambiente y su cuadro clínico principal es ser causantes de infecciones del tracto urinario, infección de heridas e infecciones intraabdominales.

### 1.5. Antibióticos

En 1920, Paul Ehrlich comenzó el tratamiento con antibióticos gracias al descubrimiento con la asfernamina para el tratamiento de la sífilis, aunque ha sido Fleming con su descubrimiento de la penicilina producida por el hongo *Penicillium notatum* quien conquistó la popularidad. En la segunda guerra mundial, la sulfonamida fue utilizada por un gran número de soldados para el tratamiento de diversas infecciones con buenos resultados. Todo ello, llevo a la comunidad científica a pensar que con el descubrimiento de estas moléculas se iban a terminar las enfermedades infecciosas, pero desde los años cuarenta, el mal uso y el exceso de utilización de antibióticos, han producido una desventaja ambiental y una amplia resistencia a los mismos<sup>113,114</sup>. La búsqueda y aparición de nuevos tratamientos, son hasta la fecha escasas y, por tanto, el objetivo es mejorar o modificar las terapias que se tienen para intentar disminuir las resistencias de las bacterias.

Los antibióticos son metabolitos secundarios pequeños producidos por la naturaleza o diseñados sintéticamente para competir contra las diferentes bacterias. Estos metabolitos, pueden actuar en diferentes puntos de la bacteria. Pueden regular el crecimiento, la virulencia, transformación, la transferencia genética, inducir la autofagia, mutagénesis, la respuesta al estrés o formar una capa protectora<sup>114</sup>.

La actividad de un fármaco está definida por su espectro antibacteriano, es decir, el conjunto de agentes patógenos que se ven afectados por las concentraciones del antibiótico que se pueden alcanzar en el paciente sin inducir toxicidad.

Los antibióticos se clasifican en: i) bactericidas: producen la muerte de los agentes infecciosos. En este grupo se encuentran los antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, poliximinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoína. ii) bacterioestáticos: inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, una vez suspendido el antibiótico, puede volver a multiplicarse. La eliminación de bacterias exige el concurso de las defensas del organismo infectado. Dentro de este grupo, encontramos las tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas, sulfamidas y trimetoprim.

Para calcular la actividad antimicrobiana se utilizan técnicas normalizadas mediante los métodos in vitro de comprobación de susceptibilidad del microorganismo en relación con el antibiótico: antibiograma y técnicas de dilución.

La sensibilidad de un germen frente a un antibiótico se clasifica según su concentración mínima inhibitoria ya que poseen un alto valor orientativo entre in vitro e in vivo. La actividad antimicrobiana, queda caracterizada según:

- a) Concentración mínima inhibitoria (CMI): es la concentración menor de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de  $10^5$  bacterias en un mililitro de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.
- b) Concentración mínima bactericida (CMB): es la concentración menor de antibiótico capaz de destruir o matar  $10^5$  bacterias e un mililitro de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

El objetivo principal de la terapia con antibióticos es alcanzar una concentración tisular del antibiótico que supere en 2-8 veces la CMI. También hay que considerar el factor tiempo o la duración entre el contacto del antibiótico con el germen y las propiedades farmacocinéticas (distribución y eliminación) que condicionan el intervalo posológico.

A la hora de administrar un tratamiento antibacteriano, en un primer escalón, se utiliza un único antibiótico para el tratamiento de una infección. De este modo, se evitan riesgos tóxicos innecesarios, se reduce el coste y se disminuye la posible aparición de resistencias.

En caso de dar dos antibióticos, las consecuencias pueden ser las siguientes:

- Sinergia: la acción combinada de los antibióticos es mayor que la suma de ambos cuando se administran por separado.
- Adición: la acción combinada es igual a la suma de las acciones independientes.
- Antagonismo: la acción combinada es inferior a la del producto más eficaz cuando se emplea sólo.
- Indiferencia: la acción combinada no es más potente que la del producto más eficaz cuando se emplea sólo.

La asociación de antibióticos está justificada para impedir la aparición de resistencias, en terapia inicial en pacientes inmunodeprimidos o con infecciones graves para así, cubrir un amplio espectro, en infecciones mixtas, para reducir la toxicidad y en casos de sinergia.

Las continuas apariciones de resistencias bacterianas a los antibióticos están actualmente dañando seriamente los estándares de salud en todo el mundo. Las resistencias multibacterianas constituyen

un significativo impacto en el bien estar de los ciudadanos, recursos clínicos y costes asociados<sup>114</sup>. Por el extenso uso de antimicrobianos, se han producido diferentes mecanismos de resistencia a ellos por parte de los microorganismos. Estas resistencias, se podrían dividir en tres grandes grupos<sup>113</sup>.

1. Disminución de la captación de fármaco
2. Modificación de la diana de acción
3. Inactivación del fármaco

Estas resistencias han sido reconocidas como un gran problema de salud humana y en clínica<sup>115</sup>. Tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos han aumentado las resistencias bacterianas a los antibióticos sobre todo en personas hospitalizadas con cáncer, lo cual conlleva más mortalidad y costes<sup>116</sup>.

El descubrimiento de nuevos antibióticos, en las tres últimas décadas, ha disminuido. Para el desarrollo de nuevos tratamientos, es muy importante, predecir las posibles resistencias que pueden aparecer en un futuro para poder abordarlas<sup>117</sup>. Una manera de abordar las resistencias bacterianas, sería monitorizar la forma que tienen los microorganismos en producir sus diversas resistencias. Mientras se obtienen nuevas terapias, los gobiernos han propuesto el uso controlado de antimicrobianos y tratar de no abusar de los mismos, para así evitar posibles resistencias.

### 1.5.1. Antibióticos seleccionados

#### 1.5.1.1. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son agentes antimicrobianos que generalmente poseen dos o tres azúcares unidos por enlaces glicosídicos a un grupo amino en un anillo aminociclitol. Tienen un amplio espectro de acción, incluyendo algunos Gram positivos y particularmente activos frente a bacterias Gram negativas incluyendo *Enterobacterias* y *Pseudomonas*<sup>118,119</sup>. Su mecanismo de acción ha sido muy estudiado e interfiere en la biosíntesis de proteínas actuando en la subunidad 30S de los ribosomas provocando la muerte celular.

A pesar de su amplio espectro, su actividad queda limitada por su nefrotoxicidad y ototoxicidad. Por ello su prescripción está muy limitada y se regulan sus dosis<sup>120</sup>. Por tanto, su uso queda reservado para el tratamiento de serias infecciones cuando otras opciones han sido probadas e ineficaces. A pesar de ello, se han descrito resistencias a los aminoglucósidos. Los distintos mecanismos pueden ser:

- Alteraciones en los puntos de unión en el ribosoma bacteriano.
- Reducción en el acceso de los aminoglucósidos al citoplasma bacteriano. Se debe a la alteración de los sistemas de transporte.
- Modificación de la estructura de los aminoglucósidos debido a la generación de enzimas bacterianos que reducen la actividad antibacteriana. Las consecuencias pueden ser; el bloqueo en el paso del antibiótico a través de la membrana y

la formación de un compuesto inactivo incapaz de alterar las funciones de los ribosomas.

Dado las complicaciones que tienen este tipo de antibióticos y el poco uso que se les puede dar debido a su toxicidad y complicaciones a la hora de la administración, nos pareció un grupo interesante de escoger para elaborar una nueva forma farmacéutica y poder intentar mejorar el tiempo de duración del tratamiento, la estabilidad y disminuir su toxicidad. Conjuntamente con el jefe de departamento de microbiología del Hospital General de Alicante, se decidió trabajar con la amikacina, fármaco de este grupo que presenta unas características que se describen a continuación.

### **Amikacina**

Este antibiótico es efectivo frente a infecciones importantes como son muchas bacterias Gram-negativa<sup>121</sup>, entre las que destacan *Pseudomonas* y también es utilizado, aunque de segunda elección en el tratamiento de fibrosis quística. Además, es el antibiótico de elección en infecciones nosocomiales<sup>120</sup>. Este antibiótico además de la problemática que tiene por ser un aminoglucósido, presenta la desventaja de tener que ser utilizado en grandes concentraciones para obtener niveles terapéuticos en los pulmones y ello provoca grandes efectos adversos de nefrotoxicidad<sup>121</sup>.

Por tanto, un sistema de liberación controlado ayudaría a obtener niveles terapéuticos adecuados reduciendo la toxicidad. Hasta la fecha se han investigado diversos sistemas como liposomas de amikacina, nebulizadores de amikacina y nanopartículas sólidas de lípidos con amikacina pero sin ser probados *in vivo*<sup>120</sup>.

## Neomicina

Este aminoglucósido se utiliza como referencia en estudios bioquímicos en las instalaciones del IBMC. Este antibiótico es utilizado por vía oral en el tratamiento de reducción de bacterias que producen amonio en el intestino y evitar así la encefalopatía<sup>122</sup>. Induce la precipitación del colesterol en las micelas digestivas, evitando así su absorción. Por este motivo, se empleó en las hiperlipoproteinemias tipo II<sup>123</sup>.

### 1.5.1.2. Quinolonas

Este grupo de antibióticos tiene una estructura química basada en el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. Este grupo de antibióticos se clasifican según su espectro de acción en diferentes generaciones denominadas de primera generación hasta cuarta generación. Conforme se aumenta de generación aumenta el campo de actuación. La primera generación posee un espectro de acción reducido a Gram negativos en infecciones urinarias, intestinales y biliares. La segunda generación, donde se encuentra la quinolona seleccionada para trabajar en esta tesis, **el ciprofloxacino**, tiene mayor potencia que los del primer grupo. Poseen mayor semivida biológica, alcanzan altos niveles séricos y tisulares y poseen un mayor espectro de acción, aunque predominantemente frente a bacterias Gram negativas. La tercera y cuarta generación además de ser activas frente a Gram negativas, también poseen actividad frente a Gram positivas anaerobias y patógenos intracelulares.

El mecanismo de acción de las quinolonas es inhibir la ADN-girasa bacteriana, enzima responsable del enrollamiento del ADN; por tanto, inhiben la síntesis de ADN al bloquear la reacción de



superenrollamiento dependiente de ATP. A concentraciones mayores, inhiben la topoisomerasa II, un enzima cuya secuencia de aminoácidos presenta homología con la girasa, y que también desempeña un papel importante en la reacción de superenrollamiento del ADN. Tiene una acción bactericida.

Las resistencias que presentan este grupo son de tipo cromosómico, debidas a modificación enzimática de la subunidad A o B de la girasa o a impermeabilidad de la pared bacteriana.

Las fluoroquinolonas, como **ciprofloxacino**, difunden ampliamente alcanzando concentraciones altas en tejidos periféricos y fluidos orgánicos, con elevada penetración en macrófagos y polimorfonucleares.

Las fluoroquinolonas que es el caso que nos ocupa, por su amplio espectro antibacteriano, semivida prolongada, gran difusión tisular, buena absorción oral y resistencia no cruzada con otros antibióticos, pueden utilizarse para el tratamiento de un amplio número de enfermedades infecciosas. Son de elección en diarrea del viajero, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*.

El ciprofloxacino, debido a que es un antibiótico ampliamente utilizado, se seleccionó para encapsularlo en nanopartículas con el fin de poder en un futuro dar un tratamiento con dosis más espaciadas y evitar las posibles resistencias bacterianas que puedan derivar en un uso excesivo.

### **1.5.1.3. Cefalosporinas**

La estructura básica de las cefalosporinas es un anillo betalactámico asociado a otro de dihidrotiazina (ácido 7-aminocefalosporánico; 7-ACA). Son dos las cadenas laterales que se

unen a este núcleo y modifican la actividad antibacteriana y las características farmacocinéticas.

Las cefalosporinas junto con las penicilinas pertenecen a los denominados antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Se caracterizan por poseer potente acción antibacteriana de carácter bactericida, amplio espectro de acción, existencia de antibióticos que resisten la inactivación enzimática inducida por las bacterias, y de inhibidores enzimáticos, buena absorción oral, buena difusión tisular y aumento de la vida media por parte de ciertos derivados y por último poseer escasas reacciones adversas.

Este tipo de antimicrobianos se clasifica en diferentes generaciones basándose en su espectro de acción, estabilidad frente a betalactamasas, CMI y actividad frente a enterobacterias.

Los betalactámicos inhiben las etapas finales de la síntesis de peptidoglicano o mureína, impidiendo la reacción de transpeptidación. Se unen a la enzima formando un enlace covalente con una serina de su centro activo, lo que produce la inactivación irreversible de la enzima.

Ejercen una acción bactericida por alterar la pared celular bacteriana, estructura que no existe en las células humanas y, por tanto, presentan una baja toxicidad.

El mecanismo de resistencia bacteriana principal es la síntesis bacteriana de enzimas inactivadores denominados genéricamente betalactamasas. Producen la hidrólisis de las moléculas del antibiótico con apertura del anillo betalactámico y su inactivación biológica. En las bacterias Gram negativas, las betalactamasas ocupan sitios estratégicos en el espacio periplasmático, inactivando el antibiótico en su camino hacia los sitios de fijación. En las bacterias Gram positivas, las betalactamasas son

expulsadas al medio extracelular por lo que, en principio, su capacidad de degradar el antibiótico es menor.

Otros mecanismos de resistencia que presentan este tipo de antibióticos son la pérdida de porinas y la producción de PBP con afinidad disminuida por los betalactámicos.

En cuanto a las reacciones adversas de las cefalosporinas, hay que tener en cuenta que pueden ocasionalmente producir nefrotoxicidad (excepto cefalotina y cefaloridina que sí presentan) pero que asociadas con aminoglucósidos se puede potenciar esta toxicidad.

El antibiótico seleccionado de este grupo fue la **cefotaxima**, perteneciente a la tercera generación de la clasificación y, por tanto, activo frente a las enterobacterias resistentes a la primera y segunda generación. Su actividad frente a *Pseudomonas* y *Bacteroides* varía de unas moléculas a otras y su actividad frente a estafilococos es inferior a la correspondiente a las cefalosporinas de primera generación.

Es un antibiótico que se utiliza en diferentes enfermedades infecciosas importantes tales como la neumonía intrahospitalaria por *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* y *E.coli* asociada a aminoglucósidos (grupo anteriormente mencionado y seleccionado en los estudios). En el tratamiento de infecciones óseas y articulares debidas a enterobacterias o *P. aeruginosa* asociada también a aminoglucósidos. En enfermedades del sistema nervioso como es la meningitis, antes de ver los estudios microbiológicos y posteriores a la toma de muestras, se trata a los neonatos con meningitis por *S.* tipo B o C, *Listeria* o enterobacterias con cefotaxima, ceftriaxona asociado a ampicilina. La asociación es debida a que el uso único de cefotaxima o ceftriaxona no es eficaz frente a *Listeria* ni estreptococos del grupo D. También se utiliza cefotaxima en

meningitis de niños infectados por *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* asociado a ampicilina y dexametasona. En adultos, se utiliza asociado a ampicilina, rifampicina y dexametasona frente a meningitis causada por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *Listeria*. Por último, las cefalosporinas de tercera generación también son utilizadas en infecciones ginecológicas (exceptuando las de transmisión sexual) tales como, endometritis, inflamación pélvica que suelen estar causadas por enterobacterias, estreptococos o *Bacteroides*.





## **Material y métodos**

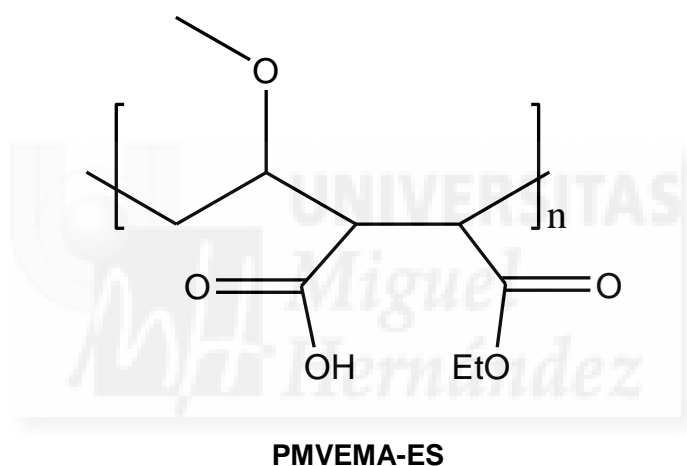


## 2. Material y métodos

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Polímero transportador

Para la elaboración de estos nanosistemas se utilizó la solución al 50% (p/v) en etanol del polímero poli (metil vinil eter-*alt*-monoéster ácido maleico) (PMVEMA-ES) con  $M_w = 130000$  g/mol (calculado por dispersión de luz) adquirida de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) y que es usado como polímero transportador.

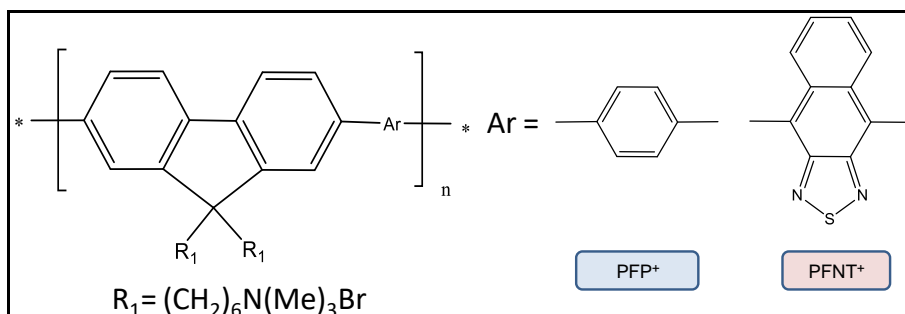


**Figura 4:** Estructura química del polímero transportador para fabricación de nanopartículas.

#### 2.1.2. Polielectrolitos conjugados

Se utilizaron los polielectrolitos señalizadores sintetizados y caracterizados en nuestro laboratorio. Los bromuros de poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)-hexilo]-2,7-fluoreno-*alt*-1,4-fenileno} (PFP<sup>+</sup>), emisor azul, lote  $M_w = 8340$  g/mol,  $M_u = 694$  g/mol y una polidispersión (PDI) de 2,00 (calibración estándar por GPC: PS) y poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-fluoreno-*alt*-naftaleno-

[2,3c]-1,2,5-tia-diazol} (PFNT<sup>+</sup>), emisor rojo, lote M<sub>w</sub> de 8990 g/mol, Mu= 716,17 g/mol y una PD de 1,99 (calibración estándar por GPC: Poliestireno (PS) (figura 5).



**Figura 5:** Estructura química de los polielectrolitos conjugados.

Brevemente, PFP<sup>+</sup> se obtiene por derivatización post-polymerización a partir del copolímero precursor neutro, poli-([9,9-bis-(6'-bromohexilo)-2,7-fluoreno-co-*alt*-1,4-fenileno]), y éste, a partir del ácido 1,4-fenildiborónico y 2,7-dibromo-9,9-bis-(6'-bromohexilo) fluoreno, con paladio (II) como catalizador y en medio básico (condiciones Suzuki). Posteriormente, este polímero neutro es tratado con trimetilamina condensada, para obtener el correspondiente polielectrolito<sup>62</sup>.

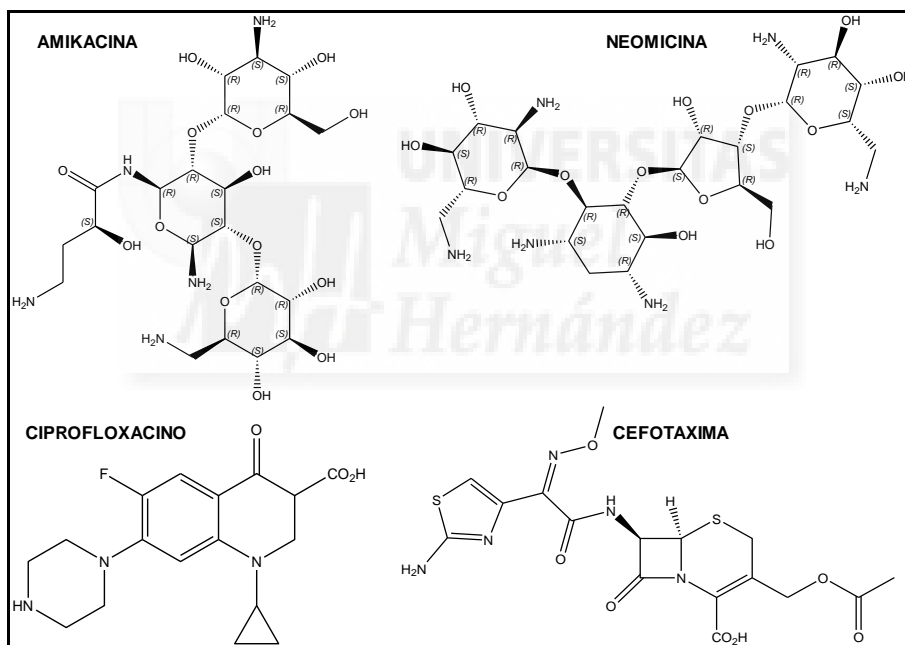
El segundo polielectrolito, PFNT<sup>+</sup>, se sintetiza por vía Suzuki, de manera análoga al PFP<sup>+</sup>, obteniendo primero el polímero bromado y posteriormente, éste se derivatiza por reacción de Menshutkin en el polielectrolito catiónico. A modo resumen, en medio básico y tolueno se adiciona el monómero 2,7-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]-dioxanoborolado)-9,9-bis(6'-bromohexilo)-fluoreno y el 4,9-dibromonaftol (2,3)-1,2,5-tridiazol y se obtiene el polímero bromado



con el anillo de naftol. Consecutivamente, por reacción con trimetilamina condensada se obtiene el polielectrolito catiónico<sup>88</sup>.

### 2.1.3. Antibióticos

La amikacina ( $M_w = 587,6$  g/mol, volumen relativo ( $V_r$ ) =  $129,85$   $\text{cm}^3/\text{mol}$ ,  $\text{pKa}$  desde 15,6 a 6,7). La cefotaxima ( $M_w = 455,06$  g/mol, volumen relativo ( $V_r$ ) =  $108,44$   $\text{cm}^3/\text{mol}$ ,  $\text{pKa} = 2,7$ ) fueron adquiridas de los laboratorios Normon (Tres Cantos, Madrid, Spain) en formato de envase clínico.



**Figura 6:** Estructuras químicas de los diferentes antibióticos utilizados.

El ciprofloxacino ( $M_w = 333,15$  g/mol, volumen relativo ( $V_r$ ) =  $89,55$   $\text{cm}^3/\text{mol}$ ,  $\text{pKa} = 8,5$  y  $3,2$ ) de los laboratorios Genéricos (Las Rozas, Madrid, Spain) también en formato de envase clínico. La

neomicina ( $M_w = 614,65$  g/mol, volumen relativo ( $V_r$ ) =  $139,78$  cm<sup>3</sup>/mol, pKas desde 13,6 a 6,6) fue comprada a Sigma-Aldrich como referencia de farmacopea (St.Louis, MO, USA) (figura 6).

Las disoluciones de trabajo para todos los antibióticos fueron realizadas con agua Milli Q y a una concentración estandar 0,5 mg/mL, alicuotadas y conservadas protegidas de la luz a -20 °C hasta ser utilizadas.

#### 2.1.4. Otros reactivos

Los diferentes disolventes empleados para la realización de los siguientes estudios tanto los de pureza HPLC (metanol, acetona, ácido fosfórico y ácido trifluoroacético) como el DMSO y etanol de purzas ambos superiores al 95% fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

El agua bidestilada y desionizada (DDW) proviene de un sistema Milli-Q Synthesis A10 (Millipore, Madrid, Spain).

El material utilizado para el desarrollo de cultivos celulares; solución de tripsina 0,25% con EDTA, medio Dulbecco's modificado con alta concentración de glucosa (4,5 g/L) con L-glutamina and bicarbonate sódico (DMEM, del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium), suero fetal bovino (FCS del inglés fetal calf serum), solución con 5000 unidades de penicilina y 5 mg/mL de estreptomicina, tampon fosfato salino a pH=7,4 (PBS), frascos de poliestireno para cultivos y placas de 96 pocillos, fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Sant Loise, MO, USA). El medio de cultivo neurobasal fue adquirido de Gibco, Life technologies (Madrid, España).

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), etanol, isopropranol anhidrido, ácido hidroclorehídrico y dimetilsulfóxido (DMSO) fueron comprados a Merk (Darmstadt, Alemania).

### **2.1.5. Cultivos**

El medio de cultivo empleado para las líneas celulares (descritas en los siguientes apartados) HaCat, HeLa, SW480 y HT-29, 3T3 y el cultivo primario de retina fue el DMEM mientras que para los cultivos primarios de corteza se utilizó el medio neurobasal.

#### **2.1.5.1. Eucariotas**

Para los ensayos biológicos *in vitro* de este capítulo, se utilizaron las conocidas líneas celulares HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados y la línea celular HeLa de cáncer humano de cérvix proporcionadas por el Prof. Antonio Ferrer, las líneas celulares de adenocarcinoma humano de colon, SW480 (ATCC® Ref.: CCL-228™) y HT-29 (ATCC® Ref.: HTB-38™) cedidas por el Dr. Miguel Saceda, de tejido colorectal y colon respectivamente y la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón cedidas y utilizadas en colaboración con el Instituto de Bioingeniería de la UMH (Prof. Eduardo Fernández Jover) junto a los cultivos primarios de corteza cerebral y retina de rata embrionada.

Todas las líneas celulares, se crecieron en frascos flasks de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C en atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.1.5.2. Procariotas

Las bacterias empleadas en este capítulo y descritas en la introducción más detalladamente son *E. coli* Top 10 F' como referente de Gram negativa procedente de Sigma-Aldrich (Sant Loise, MO, USA). Cedidas y caracterizadas por el departamento de microbiología del Hospital General Universitario de Alicante (Prof. Juan Carlos Rodríguez) se encontrarán *E. coli* BLEE (Gram negativa), especie resistente a antibióticos y, por otra parte, *S. aureus* y *K. pneumoniae* como especies Gram positivas procedentes de muestras clínicas y habrá resistentes, representadas con una R y no resistentes representadas con una S.

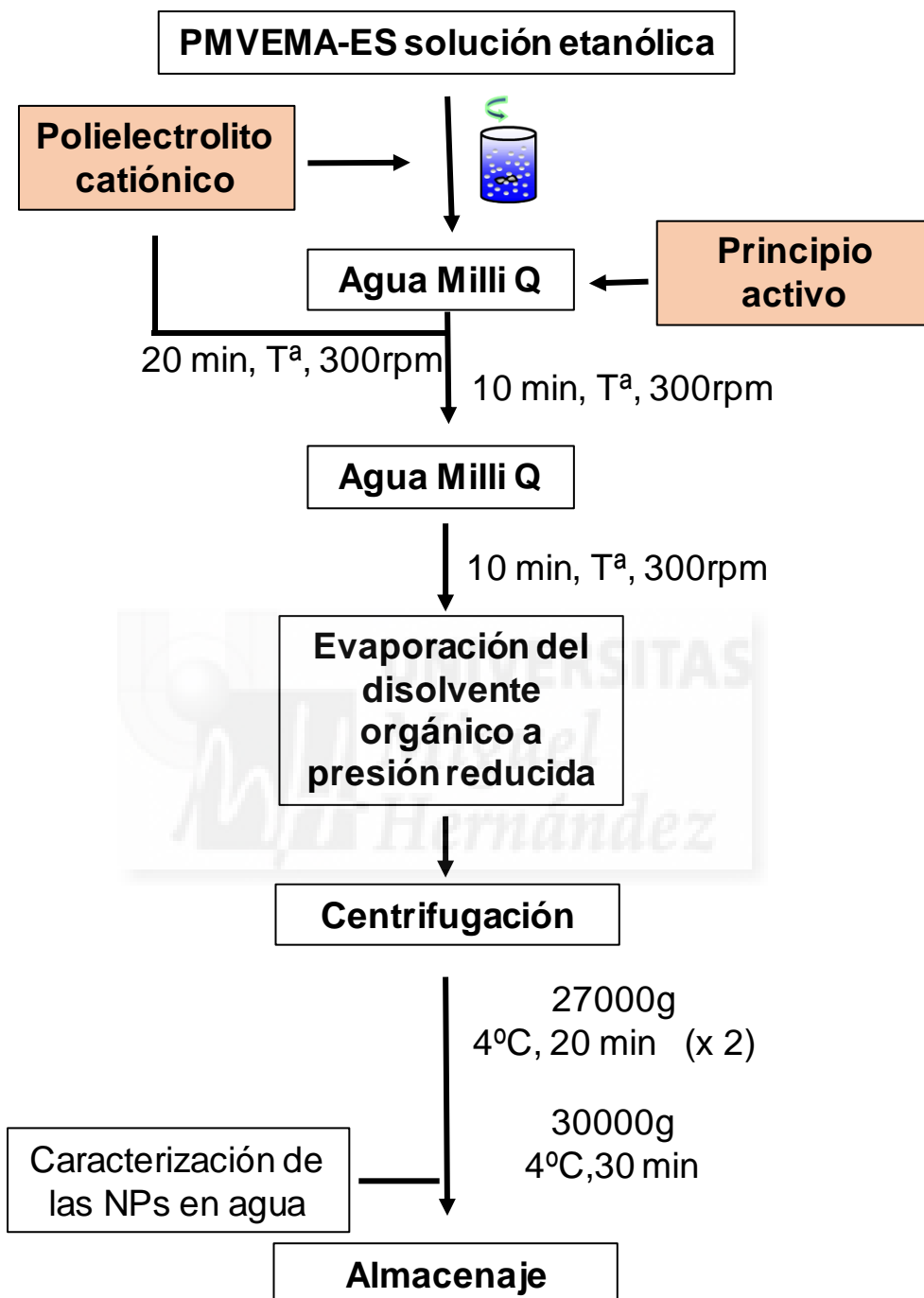


## 2.2. Instrumentación y metodología

### 2.2.1. Metodología de preparación de nanopartículas

Para elaborar las nanopartículas de PMVEMA-ES, se seleccionó el método de desplazamiento de disolvente (sección 1.1 de la introducción de este capítulo) y fue una modificación del procedimiento descrito previamente por Hesham y col.<sup>94</sup>. El PMVEMA-ES se disolvió al 2% p/p en etanol y permaneció bajo agitación magnética durante 10 min a 300 rpm (revoluciones por minuto) y temperatura ambiente (T<sup>a</sup>). Posteriormente se añadieron los PCs correspondientes para alcanzar las concentraciones deseadas en cada caso (1,5; 5; 10 y 15  $\mu$ M). Tras 20 min en agitación a 300 rpm, protegido de la luz y T<sup>a</sup> se añadió finalmente el antibiótico disuelto en agua y se mantuvieron las condiciones de agitación magnética durante 10 min. Trascurrido este tiempo, se completó lentamente con agua Milli Q hasta alcanzar una concentración de PMVEMA-ES de 10 mg/mL. A continuación, se eliminó todo el disolvente orgánico mediante presión reducida (rotavapor) y, por último, se purificaron las muestras a 20000g, 20 minutos y 4 °C (dos veces) y después de separar el concentrado del sobrenadante, este último se centrifugó a 30000g, 30 minutos y 4 °C (figura 7).

Las muestras y los sobrenadantes se conservaron a -20 °C para su posterior utilización.



**Figura 7:** Esquema de fabricación de nanopartículas.

### 2.2.2. Espectroscopia de correlación de fotones

Para obtener el tamaño de las nanopartículas e información sobre la variabilidad de este en la suspensión total, así como sobre su carga eléctrica total se procedió a determinar el diámetro hidrodinámico y potencial Z de cada una de las formulaciones mediante esta técnica (Espectroscopia de correlación de fotones), también denominada dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"). En este punto señalar que el potencial Z es una medida de la magnitud de repulsión o atracción entre las partículas que proporciona una idea detallada de los mecanismos de difusión. Para ello se utilizó un equipo 90 Plus Nanoparticle Size Analyzer (Brookhaven Instruments) que consta de una fuente láser de diodo rojo de 35 mV ( $\lambda=640$  nm) cuyo haz es de ángulo regulable. En este trabajo las muestras de las diferentes formulaciones (diluidas en agua Milli-Q), se midieron a  $90^\circ$  en cubetas cuadradas desechables de poliestireno de 1 cm de y 4,5 mL de volumen (BI-SCP) para evitar que posteriores medidas se contaminen de restos de cualquier polímero utilizado e interfiriese en las medidas. Las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como la media y el error como  $\pm$  desviación estándar (sd) de tres experimentos diferentes.

### 2.2.3. Microscopía óptica de fluorescencia

Mediante esta metodología, y debido a la propiedad fluorescente de los PCs se pretendió describir la localización de las nanopartículas objeto de este estudio en células eucariotas. Para ello, se tratan células tanto de las líneas celulares HeLa S3 y 3T3 así como de cultivos primarios de corteza cerebral y retina de rata embrionaria. En las líneas HeLa S3 y 3T3 con densidades celulares de 300.000

células/pocillo se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la formulación a un volumen final por pocillo de 1000  $\mu\text{L}$  y se mantuvo durante 96h a 37 °C, así como, en los cultivos primarios de corteza cerebral y retina de rata embrionaria con densidades celulares de 100.000 células/pocillo se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la formulación en un volumen final del pocillo de 500  $\mu\text{L}$  y se mantuvo durante una semana. Tiempo durante el que las células fueron incubadas a 37 °C en un incubador con aporte de aire con 5% de  $\text{CO}_2$  y 5% de  $\text{O}_2$ .

Al cabo de ese tiempo, se retiraron los tratamientos y se añadió el medio fresco correspondiente a cada tipo células previamente a la toma de imágenes. Las imágenes fueron tomadas con un **microscopio AxioObserver Z1 (Carl Zeiss)** con sistema ApoTome acoplado y dotado de un software de análisis de imagen ZEN 2 (Blue Edition). Todas las imágenes de un mismo experimento fueron tomadas con los mismos parámetros y ajustes de ganancia y filtros de fluorescencia.

Para los ensayos realizados con los microorganismos, el objetivo era ver el marcaje positivo o negativo de las bacterias y compararlo con líneas celulares. Para ello se emplearon dos especies bacterianas, una Gram negativa, *E. coli* Top 10 F' y *S. aureus* como Gram positiva. Como línea celular, se recurrió a las células HeLa. El equipo utilizado para la toma de imágenes, fue el **microscopio Leica DMI 3000 B invertido**, equipado con una fuente de luz compacta Leica EL6000 y una cámara digital Leica DFC 3000G. Las imágenes siguientes se realizaron a 63x con objetivo de 0.7 y filtro DAPI (Ex: BP 350/50, Em: BP 460/50) o DsRed (Ex: BP 555/25, Em: BP 620/60). El procesamiento de las imágenes, se realizó manualmente mediante el programa Leica Application Suite AF 6000 Module Systems)<sup>74</sup>.



#### **2.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Con este equipo se tuvo como objetivo confirmar el tamaño de las nanopartículas midiendo su diámetro y compararlo con el tamaño obtenido por DLS, describir la morfología y realizar un estudio de localización de las nanopartículas en cultivos primarios (los mismos cultivos utilizados que para los ensayos con microscopía de fluorescencia).

El microscopio electrónico de transmisión Jeol 1011 (Jeol, Japan) trabaja con fenómenos físico-atómicos que surgen al choque entre un haz de electrones acelerado (100-1000kV) y una muestra finamente preparada. Al colisionar los electrones, dependiendo del espesor de la muestra y del tipo de átomos que la forman, los electrones son dispersados bien si atraviesan directamente las muestras o si son totalmente desviados. La información que se obtiene es una imagen con intensidades diferentes en la escala de los grises según la dispersión de los electrones incidentes.

Para determinar la morfología y confirmar el tamaño de las nanopartículas se dispuso una gota (10  $\mu$ L) de la solución de nanopartículas sobre una rejilla de de cobre de 3 mm de diámetro (portaobjetos adecuados para microscopia electrónica) de Electron Microscopy Sciences (Hatfield) dejándolas secar a temperatura ambiente durante unos minutos previamente a la observación en el microscopio.

Por su parte, el estudio de la localización de las nanopartículas utilizó células de cultivo primario de corteza cerebral de rata embrionaria. Para ello, se trató un cultivo primario de corteza cerebral de rata embrionaria con 50 microlitros de nanopartículas y se incubó durante 72 horas. Tras este tiempo, se procedió a la inclusión del cultivo para poder analizarlo mediante microscopía electrónica de

transmisión. El cultivo se fijó con una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1 M durante 4 horas. Después se lavó 3 veces con tampón cacodilato 0,1 M durante 10 minutos cada uno. El último lavado se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se fijó con tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato 0,1M durante 1 hora a 4°C. Se volvió a lavar 3 veces con tampón de cacodilato 0,1M durante 10 minutos cada uno. Posteriormente a los lavados, el cultivo se deshidrató con secuencias crecientes de alcohol; desde 30 a 100 (30, 50, 70, 96 y 100) y manteniéndolos en cada concentración durante 10 minutos, salvando que para la última concentración se repitió por triplicado.

A continuación, se introdujo en una solución acetona-alcohol 1:1 durante 10 minutos y, seguidamente acetona-alcohol 2:1 durante otros 10 minutos. Se lavaron dos veces con acetona durante 10 minutos y se pasaron a acetona-Epon 1:1 durante 1 hora. Se dejaron toda la noche en Epon y al día siguiente se hicieron los bloques y se polimerizaron en una estufa a 58-60°C durante 24 horas. Obtenidos los bloques, se cortaron con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT MZ6) cortes ultrafinos de 100 nanómetros, y los cortes se recogieron sobre rejillas de cobre. Estas rejillas, se sometieron a un contraste posterior con acetato de uranilo al 1%, agua destilada y citrato de plomo al 0,03%. Una vez contrastadas las rejillas, se secaron sobre papel de filtro (Whatman) y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión.

### **2.2.5. Espectroscopia de fluorescencia**

Con este ensayo se quiso comprobar si había alguna diferencia entre las intensidades de fluorescencia de las

nanopartículas con respecto a los polielectrolitos conjugados sin encapsular en medio acuoso.

Las medidas de fluorescencia de las nanopartículas se analizaron mediante un espectrofotómetro QuantaMaster (Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA) interconectado con celdas Peltier. Las muestras se introdujeron en cubetas de cuarzo de 10 mm x 10 mm. Todas las medidas para el polímero emisor en azul se realizaron con las mismas aperturas de rejillas, al igual que para el polielectrolito emisor en el rojo. Los experimentos se realizaron por triplicado con distintos lotes de nanopartículas.

#### **2.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución**

Esta técnica se utilizó para cuantificar las cantidades de antibiótico encapsulado y determinar la eficiencia de encapsulación, así como valorar la integridad de estos tras el proceso de encapsulación. Para desarrollar esta técnica, comúnmente denominada HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography) se empleó la misma columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para todos los antibióticos analizados en esta tesis. Todos los análisis fueron llevados a cabo a temperatura ambiente y equilibrando la columna con su precolumna (4 x 4 mm i.d.) durante 30 minutos con anterioridad al análisis de las muestras.

Para la elaboración de las curvas de calibrado, los antibióticos fueron disueltos en agua Milli Q a diferentes concentraciones cuyo rango estuvo comprendido entre 3,13 y 300  $\mu$ g/mL. Entre estos valores se observó una correlación lineal entre concentración y el valor del área delimitada por el pico detectado para cada antibiótico en

el cromatograma y la línea basal. Cada punto de la curva de calibrado corresponde a la media de tres medidas.

Las muestras analizadas corresponden al sobrenadante resultante de la purificación de las nanopartículas durante el último paso del proceso de la síntesis de éstas (ver sección 2.2.1 de este capítulo). Para valorar la eficacia de encapsulación (EE%), se cuantificó la cantidad de antibiótico no encapsulado (sobrenadante). Con los datos obtenidos, se calculó la cantidad de antibiótico que quedaba en las nanopartículas por simple diferencia con respecto a la cantidad inicial añadida en la fabricación de nanopartículas. Este procedimiento cuenta con la ventaja de la menor cantidad de impurezas (otros compuestos que no son antibiótico utilizados para la síntesis de las nanopartículas) que puedan dificultar la detección y cuantificación del antibiótico en el cromatograma<sup>40,94,121,124</sup>. Por tanto, la eficiencia de encapsulación (EE%) de los antibióticos en las nanopartículas se calculó mediante la relación entre la cantidad de antibiótico inicial ( $Q_0$ ) utilizado para la elaboración de las nanopartículas y la cantidad final ( $Q_f$ ) en las nanopartículas según la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = (Q_f / Q_0) \times 100$$

Los equipos utilizados para el análisis de los antibióticos fueron tres cromatógrafos diferentes, todos ellos en las instalaciones del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC):

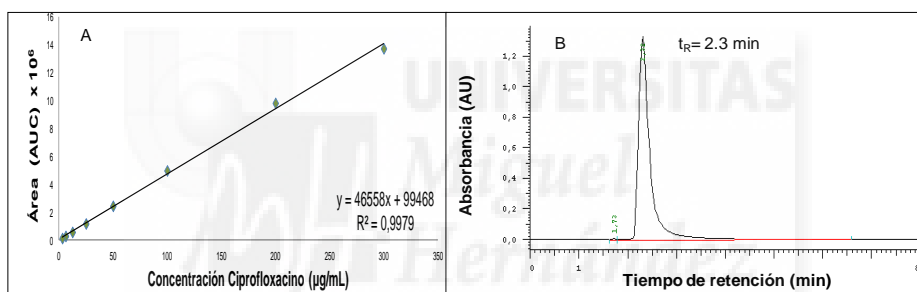
HPLC Hitachi (Merck Hitachi LaChrom) que consta de una bomba L-7100, un detector automático L-7200, horno para la columna y un detector de diodo array L-7455. Los datos fueron analizados utilizando el software D-7000 HSM para LC system.

- A.** HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.) controlado por el software ChemStation y equipado con una bomba G1311A Quat PUMP, un inyector automático G1329A ALS, horno para la columna y un detector de diodo array G1316A.
- B.** HPLC Shimadzu LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japón) con un módulo de comunicaciones CBM-20A, un automuestreador SIL-10AF y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD 3300, Alltech Associates, Inc.). Para el procesado de datos se utilizó el programa LabSolutions Lite for HPLC system.

Los métodos analíticos utilizados para cada antibiótico se describen a continuación y todos son ellos modificaciones realizadas a partir de las referencias que se van a citar.

### 2.2.6.1. Método de ciprofloxacino

Para el análisis cromatográfico del ciprofloxacino se utilizó el equipo **A** con un método isocrático utilizando como fase móvil una mezcla de ácido fosfórico 0,25 M (16,85 mL/L de ácido fosfórico al 85%,  $d=1,71$  g/mL y grado HPLC) y acetonitrilo 75:25 (v/v). El flujo fue de 0,8 mL/min y las condiciones cromatográficas fueron: volumen de inyección de 20  $\mu$ L, tiempo de análisis de 8 minutos y la longitud de onda a la que se leyeron los datos fue de 280 nm<sup>125</sup>. En la siguiente figura se puede observar la curva de calibrado y un ejemplo de perfil cromatográfico obtenidos con este método para este antibiótico.

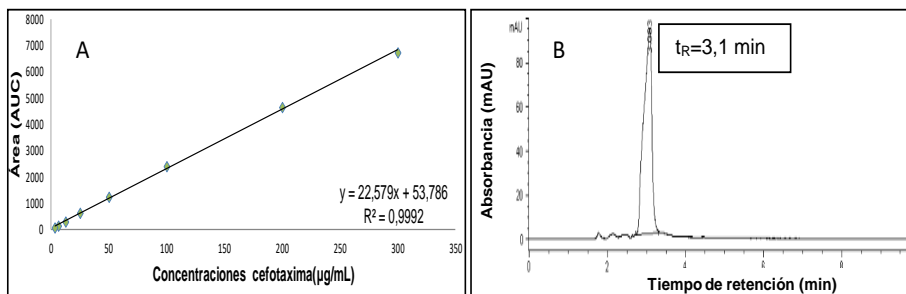


**Figura 8:** A) Recta de calibrado del ciprofloxacino. B) Perfil cromatográfico a  $\lambda=280$  nm del punto de 200  $\mu$ g/mL del ciprofloxacino.

### 2.2.6.2. Método de cefotaxima

Con este antibiótico, el análisis fue llevado a cabo con el equipo **B** mediante un método isocrático con una fase móvil metanol:agua 30:70 (v/v), ajustando el pH a 4.0 con ácido acético glacial. El flujo que se utilizó fue de 0,8 mL/min. En este caso, el volumen de la inyección fue de 5  $\mu$ L, y se detectó a 235 nm con un tiempo de análisis de 10 minutos<sup>126</sup>. En la siguiente figura se puede

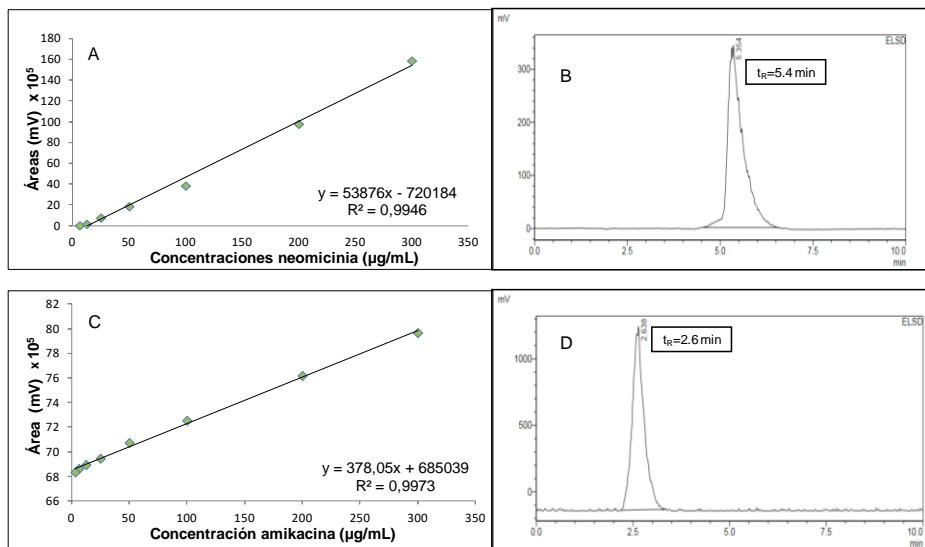
observar la curva de calibrado y un ejemplo de perfil cromatográfico obtenidos con este método para este antibiótico.



**Figura 9:** A) Recta de calibrado de cefotaxima. B) Perfil cromatográfico a 235 nm del punto de 200 µg/mL de cefotaxima.

### **2.2.6.3. Método de amikacina y neomicina**

El análisis cromatográfico de ambos antimicrobianos, se realizó mediante el equipo **C**. El procedimiento empleado reunía las características de un método isocrático con una fase móvil de acetona:agua 50:50 (v/v) con 1,50 mL TFA por litro y un flujo de 1,0 mL/min. Las condiciones para el detector evaporativo (ELSD) fueron: presión de nitrógeno de 3,5 bar, temperatura de evaporación 45 °C y la ganancia del detector de 16. El tiempo de análisis requerido para ambos antibióticos fue de 10 minutos. En la siguiente figura se observan las curvas de calibrado y un ejemplo de perfil cromatográfico obtenidos con este método para ambos antibióticos<sup>127</sup>.



**Figura 10:** A) Recta de calibrado de neomicina. B) Perfil cromatográfico del punto de 200  $\mu\text{g/mL}$  de la neomicina. C) Recta de calibrado de la amikacina. D) Perfil cromatográfico del punto de 200  $\mu\text{g/mL}$  de la amikacina.

En la tabla siguiente se resumen los métodos analíticos descritos para determinar cuantitativamente cada antibiótico, así como los datos cromatográficos relevantes como son el tiempo de retención ( $t_R$ ) y el factor de retención de la columna. El  $t_R$ , nos indica en cada caso, como a pesar de añadir polielectrolitos conjugados a las diferentes nanopartículas con antibióticos, éstas no modifican su perfil cromatográfico. El factor de retención, es una medida del tiempo que un compuesto permanece en la fase estacionaria, en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil. Matemáticamente, es la relación entre el tiempo de retención ajustado del compuesto y el tiempo muerto del eluyente en esa columna para ese método.



**Tabla 2:** Resumen de los métodos analíticos empleados en la determinación de los antibióticos ensayados.

Antibiótico	E*	Método analítico	t <sub>R</sub> (min)	k <sup>1</sup>
<b>Ciprofloxacino</b>	A	Isocrático 0,25M ác. fosfórico /acetonitrilo 30:70 (v/v). Flujo:0,8 mL/min; V <sub>i</sub> <sup>2</sup> =20 µL; t <sub>a</sub> <sup>3</sup> =8 min; λ <sup>4</sup> <sub>lectura</sub> =280 nm;	2,4±0,1	1,34
<b>Cefotaxima</b>	B	Isocrático Metanol/agua 30:70 (v/v). Flujo:0,8 mL/min; V <sub>i</sub> =5 µL t <sub>a</sub> =10 min; λ <sub>lectura</sub> =235 nm	3,1±0,1	1,4
<b>Neomicina</b>	C	Isocrático	5,4±0,1	4,2
<b>Amikacina</b>		Acetona/agua 50:50 (v/v). Flujo:1,0 mL/min; V <sub>i</sub> =10 µL t <sub>a</sub> =10 min	2,6±0,1	2,0

\*E= equipo

<sup>1</sup> k= factor de retención.

<sup>2</sup> V<sub>i</sub> = volumen de inyección.

<sup>3</sup> t<sub>a</sub> = tiempo de análisis.

<sup>4</sup> λ<sub>lectura</sub> = longitud de onda de lectura.

## 2.2.7. Ensayos de actividad antimicrobiana

### 2.2.7.1. Consideraciones previas

En un principio, para evaluar la capacidad antimicrobiana de las diferentes formulaciones, se utilizaron de manera preliminar diferentes métodos para determinar la concentración inhibitoria del 90% ( $CI_{90}$ ) y/o la concentración mínima inhibitoria (CMI) en una cepa de laboratorio de *E. coli* (Top 10 F'). Finalmente se optó por el método de la microdilución en caldo de cultivo para realizar los test de susceptibilidad antimicrobiana determinando la CMI en otras especies y/o cepas de bacterias más relevantes en salud humana.

La selección de este método fue por su facilidad tanto para automatizar el trabajo como para la interpretación de resultados. Esta técnica es también una de las recomendadas para este fin por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos<sup>128</sup>. El caldo de cultivo utilizado fue el Mueller-Hinton (MH), el cual es el recomendado por esta misma institución<sup>128</sup> como el medio de elección para las pruebas de susceptibilidad de los organismos aeróbicos o facultativos comúnmente aislados y de rápido crecimiento porque: (i) presenta muy pocas diferencias entre los distintos lotes comerciales, (ii) es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprima y tetraciclina, (iii) en él crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas, (iv) permite satisfactoriamente el crecimiento de la mayoría de los patógenos y (v) existe una gran cantidad de datos y experiencias sobre estas pruebas usando este medio. Para organismos más exigentes este medio se suplementaría con los compuestos necesarios.

Previamente a esta decisión, se realizó la evaluación de  $CI_{90}$  de los polielectrolitos PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> por el método de conteo de

colonias, aunque posteriormente se realizará con el método de microdilución en caldo.

Otros ensayos realizados fueron la evaluación de la actividad antimicrobiana de los polielectrolitos conjugados fluorescentes en tampón fosfato con diferentes concentraciones de sal cloruro sódico (NaCl), para valorar y comparar la influencia de estos iones en los polímeros y la influencia del polímero comercial en la actividad antimicrobiana, tanto en forma de nanopartícula como libre.

#### **2.2.7.2. Determinación de la $CI_{90}$ mediante el análisis de unidades formadoras de colonias (UFCs)**

El objetivo de esta técnica era acotar la  $CI_{90}$  de los PCs PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>. Para ello se adaptó con algunas modificaciones un protocolo descrito por Y.P. Lai y col. (2006)<sup>129</sup>. Brevemente, partiendo de una disolución previamente titulada de *E. coli* (cepa Top 10 F<sup>-</sup>) conservado a -80 °C en medio de cultivo LB (medio Luria Bertani) con un 15% de glicerol se realizó una dilución de bacterias a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFCs/mL en tampón fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl. A continuación, esta dilución se mezcló en una relación 1:1 (v/v) con concentraciones crecientes de cada PC en el mismo tampón usado para diluir las bacterias. La concentración final de bacterias utilizada fue, por tanto,  $1 \times 10^6$  UFCs/mL. Como control negativo se usó neomicina (Sigma Aldrich) a una concentración de 0,25 µg/mL y como control positivo tampón fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl más la cantidad de disolvente correspondiente (DMSO, Metanol y Etanol) presente en los PCs a las concentraciones experimentales. También como control negativo se prepararon muestras con sólo tampón fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl. Estas muestras se incubaron durante 6h a 37°C. Transcurrido este tiempo se diluyeron en serie en

LB, se inocularon (100 $\mu$ L) en placas de LB agar y se incubaron durante la noche (*overnight*) a 37°C. Finalmente se procedió a contar las colonias que habían crecido. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados están expresados en media de porcentaje (%) y su error como desviación estándar (sd) respecto al control. Los resultados que no presentan este error es debido a que no surgió ninguna variabilidad entre los experimentos realizados.

### **2.2.7.3. Determinación de la CI<sub>90</sub> mediante el análisis de la DO620**

La determinación de la CI<sub>90</sub> también se realizó midiendo la turbidez de los cultivos tratados. La turbidez se correlaciona con la cantidad de bacterias en suspensión en un medio líquido, de forma que la disminución de turbidez implica inhibición del crecimiento bacteriano en estos ensayos. La turbidez se puede cuantificar midiendo la absorbancia a 620 nm (densidad óptica, DO620). Al disponer de lectores (espectrofotómetros) de placas, estos ensayos se pueden realizar en placas multipocillo. Este método permite, por tanto, y de ahí la razón de probar a utilizar este método, trabajar y analizar un mayor número de muestras en menos tiempo al requerir menos manipulación experimental, ser fácilmente automatizable y a que la toma de valores la realice una máquina, la cual es además más precisa.

El desarrollo de los ensayos usando esta metodología es muy similar a la descrita anteriormente mediante el análisis de UFCs. Brevemente, los diferentes tratamientos fueron dispuestos diluidos en serie en una placa de 96 pocillos, junto con los respectivos controles, en un volumen de 50  $\mu$ l (en tampón fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl). A continuación, en cada pocillo que correspondiera fueron inoculados 50  $\mu$ l de una dilución de bacterias (procedentes de una

disolución titulada) a una concentración de  $2 \times 10^5$  UFCs/mL en tampón fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl. Las concentraciones finales consideradas son por tanto la mitad de las añadidas originalmente al diluir ambas 1:1 en la mezcla. Estas muestras se incubaron durante 6h a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadió 100  $\mu$ l de medio MH por pocillo y se se incubaron durante la noche a 37°C. Finalmente se procedió a medir la DO620 en un lector de placas (Biotek EON, Biotek Instruments, Winooski, UT, USA). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados están expresados en media de la inhibición del crecimiento en porcentaje (%) y su error como desviación estándar (sd) respecto al control.

Los resultados que no presentan este error es debido a que no surgió ninguna variabilidad entre los experimentos realizados.

#### **2.2.7.4. Determinación de la CMI mediante el método de la microdilución en caldo de cultivo**

Este método se denomina "microdilución" porque implica el uso de pequeños volúmenes de caldo dispensados en placas estériles de plástico multipocillo. Este método está descrito tanto por el NCCLS<sup>128</sup> como en la norma ISO 20776-1<sup>130</sup>. Existen paneles comerciales para uso profesional con antibióticos y concentraciones estándar. Sin embargo, en este caso los paneles con las concentraciones de las formulaciones experimentales fueron diseñados en el laboratorio y dispensados manualmente. La microdilución se realizó en placas de 96 pocillos (Kartell S.p.A, Noviglio, Italia), siendo el volumen final en cada pocillo de 200 $\mu$ L, lo que implica que antes de la inoculación de la placa con 100 $\mu$ L de cultivo bacteriano había previamente dispensados 100 $\mu$ L en cada pocillo de cada formulación, estando estas distribuidas en un gradiente de concentraciones de diluciones 1:2 en serie.

Señalar que estas diluciones fueron distribuidas en las placas y congeladas el día anterior a la inoculación en ellas de las bacterias, lo cual era realizado en las instalaciones del Departamento de Microbiología del Hospital General de Alicante al tratarse de cepas clínicas.

Por esta razón, previamente a la realización de estos experimentos se comprobó que la congelación de las formulaciones en estas condiciones no alteraba su actividad antimicrobiana. El volumen de 100 $\mu$ L correspondientes a las diluciones estaban compuestos por 50 $\mu$ L de la dilución de cada formulación propiamente dicha en agua más 50 $\mu$ L de caldo MH añadido posteriormente. Con el fin de que en cada dilución de formulación sólo variase la concentración de antibiótico, en las diluciones las cantidades de NPs y/o PCs eran compensadas en este gradiente para mantenerlas constantes a las concentraciones de 2,5 mg/mL (PMVEMA-ES en NPs) y 3,75  $\mu$ M, respectivamente, en los 200 $\mu$ L finales. El rango de concentraciones de antibiótico en el gradiente de cada formulación de NPs depende por tanto de la eficiencia de encapsulación alcanzada en cada una de las síntesis de éstas, siendo la concentración más alta (la inicial en cada gradiente) 4 veces menor que la encapsulada al estar ésta diluida 4 veces en los 200 $\mu$ L finales. Consecuentemente, el gradiente de concentraciones de antibiótico en los controles (antibiótico sólo o con PCs en disolución) fue adaptado al de la formulación con mayores porcentajes de encapsulación en cada panel. En la tabla 3 se detalla la eficiencia de encapsulación y concentración de cada antibiótico en las distintas formulaciones de los lotes utilizados para estos ensayos, así como la concentración inicial (total en 200 $\mu$ L) del gradiente antibiótico en cada una de estas formulaciones y de los controles de antibiótico previamente mencionados.

**Tabla 3:** Eficacia de encapsulación, concentración de antibiótico, concentración inicial del gradiente antibiótico y controles de antibiótico en cada formulación.

<b>Antibiótico</b>	<b>Formulación</b>	<b>EE(%)<sup>a</sup></b>	<b>CE<sup>b</sup> (µg/mL)</b>	<b>CIG<sup>c</sup> (µg/mL)</b>
<b>Amikacina</b>	Controles	-	-	11,5
	NP sin PEC	18	36	9
	NP con PFNT	18	36	9
	NP con PFP	23	46	11,5
<b>Neomicina</b>	Controles	-	-	24,5
	NP sin PEC	37	74	18,5
	NP con PFNT	33	66	16,5
	NP con PFP	49	98	24,5
<b>Ciprofloxacino</b>	Controles	-	-	32,5
	NP sin PEC	65	130	32,5
	NP con PFNT	53	106	26,5
	NP con PFP	54	108	27
<b>Cefotaxima</b>	Controles	-	-	31,5
	NP sin PEC	74	148	37
	NP con PFNT	61	122	30,5
	NP con PFP	63	126	31,5

<sup>a</sup> Eficacia de encapsulación para el lote concreto utilizado en estos ensayos.

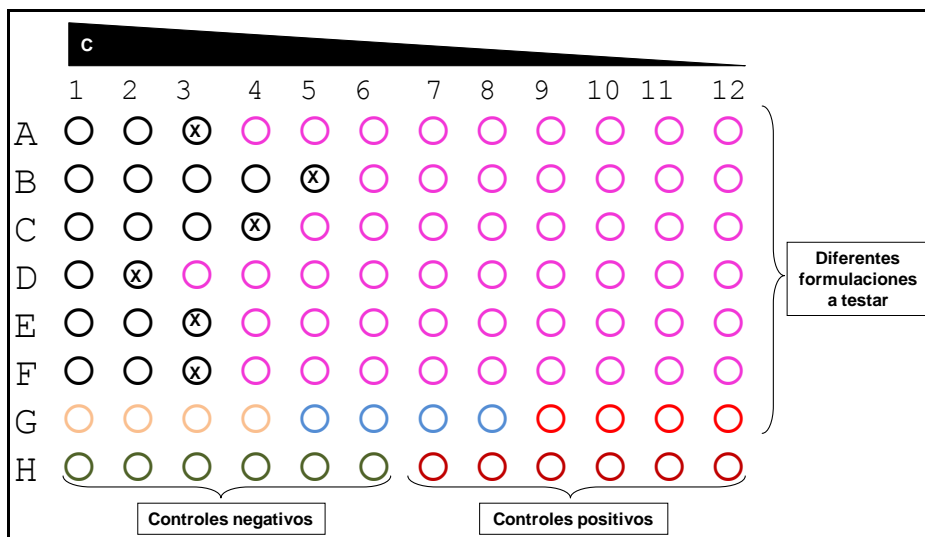
<sup>b</sup> Concentración encapsulada.

<sup>c</sup>Concentración inicial del gradiente.

Una vez preparadas estas diluciones se procedió a la inoculación de la placa con 100 $\mu$ L del cultivo bacteriano correspondiente por pocillo. Para ello, colonias de cada una de las especies de bacterias se sembraron y dejaron crecer en placas Petri con agar sangre (Biomérieux, Madrid, España) durante toda la noche en un incubador a 37 °C, recuperadas al día siguiente con un asa de siembra y resuspendidas en aproximadamente 1 mL de PBS. La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFCs) resuspendidas fue medida con un turbidímetro DensiCheck Plus McFarland (Biomérieux, Madrid, España) y a dicha resuspensión se le añadió más bacteria o PBS hasta alcanzar un valor de 0,5 unidades McFarland, estándar que contiene  $1,4 \times 10^8$  UFC/mL. Esta resuspensión fue entonces diluida cien veces en caldo MH y usada para inocular los paneles.

Tras su inoculación, los paneles fueron incubados durante toda la noche a 37 °C y posteriormente analizados para determinar visualmente el último pocillo en cada gradiente que no presentaba turbidez como consecuencia de la presencia/crecimiento de bacterias. En aquellos casos en los que debido a un crecimiento débil del inóculo la determinación visual de la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano era difícil, esta se determinó mediante la medición de la densidad óptica a 620 nm (DO620) en un lector de placas (Biotek EON, Biotek Instruments, Winooski, UT, USA).





**Figura 11: Placa resultante de un ensayo mediante el método de la dilución en caldo.** X CMI de las diferentes fórmulas probadas. Fila G: 4 pocillos de NPs PMVEMA-ES, 4 pocillos de NPs PMVEMA-ES + 0,75  $\mu$ M PFP<sup>+</sup> y 4 pocillos de NPs PMVEMA-ES + 0,75  $\mu$ M PFNT<sup>+</sup>.

Como anteriormente se ha comentado, los estudios preliminares se realizaron con una cepa de *E. coli* disponible en el laboratorio (Top 10 F') para después continuar con la determinación de la CMI de las distintas formulaciones en otros grupos de bacterias potencialmente patógenas en humanos. Estas bacterias patógenas incluyen especies Gram positivas y Gram negativas, así como cepas multirresistentes a antibióticos (Tabla 4). Los ensayos con estos microorganismos fueron realizados en las instalaciones del Hospital General de Alicante en colaboración y supervisión del doctor Juan Carlos Rodríguez.

**Tabla 4:** Listado de las especies de bacterias utilizadas para la determinación de la CMI de las formulaciones experimentales.

Clasificación	Susceptibilidad	Especies	
Gram	a antibióticos		
Gram positivas	Sensibles	<i>E. faecalis</i> *	<i>S. aureus</i>
		<i>E. faecium</i> *	<i>S. aureus</i>
	Resistentes		(resistente)
Gram negativas	Sensibles	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		<i>E. coli</i> BLEE	<i>K. pneumoniae</i>
	Resistentes	(resistente)	(resistente)

**\*NOTA:** Ambas especies bacterianas quedaron excluidas de ensayos posteriores por resultar extremadamente resistentes con las concentraciones de antibiótico probadas (CMI > 256 µg/mL). Además, se realizaron pruebas preliminares con NPs obteniéndose resultados que no mejoraban la respuesta.

Una variante de este método desarrollado es el que empleamos en el IBMC antes de acudir a las instalaciones del Hospital General de Alicante y que se utilizó para los ensayos comentados en consideraciones previas. Es un método de microdilución en caldo, pero realizado con medio LB y en lugar de sembrar directamente la sustancia y la bacteria en medio LB como sucede en el explicado que se siembra directamente en medio MH, aquí, se mantienen las diferentes concentraciones a testar mezcladas

con la correspondiente concentración de bacterias durante 6h (en el caso que nos ocupa) a 37 °C en tampón fosfato 10 mM-10 mM NaCl y posteriormente se disponen las cantidades necesarias en las placas de 96 pocillos con el medio LB y se dejan durante toda la noche a 37 °C para transcurrido este tiempo proceder a la lectura de placa.

Esta variación del método, se realizaba debido a la visulización por nuestra parte que el medio LB parece que ejercía una acción inhibitoria sobre la actividad antimicrobiana del polielectrolito, por tanto, se decidieron realizar los ensayos con la modalidad de microdilución en caldo modificado.

### **2.2.8. Ensayos de citotoxicidad**

Para realizar los cultivos de células, el medio DMEM fue tratado con un 10% de FCS y 100 unidades de penicilina y 0,1mg de estreptomicina/mL (Sigma-Aldrich). Para la medida de los ensayos de viabilidad celular, se prepararon 5 mg/mL de solución madre de MTT en PBS y se almacenaron a -20°C antes de su uso (ver sección 2.1.5 de materiales de este capítulo).

#### **2.2.8.1. Ensayo de viabilidad MTT de los polielectrolitos conjugados en línea celular**

Los ensayos de viabilidad conocidos como MTT están basados en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, presente en las mitocondrias de todas las células vivas. Si el color azul-violeta del MTT vira hacia un color más azul significa que las mitocondrias de las células sanas y vivas son capaces de reducir el MTT.

Para los ensayos biológicos *in vitro* de este capítulo, se utilizaron las conocidas líneas celulares HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados proporcionadas por el Prof. Antonio Ferrer y la línea celular de adenocarcinoma humano de colon HT-29 (ATCC® Ref.: HTB-38™) cedida por el Dr. Miguel Saceda, de tejido colorectal y colon respectivamente. El medio celular previamente descrito se utilizó para todas las líneas celulares. Al igual que todas ellas se crecieron en frascos flasks de 25cm<sup>2</sup> a 37°C en atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub>.

Se analizó la toxicidad en las líneas celulares descritas tanto de los polielectrolitos individualmente como de las nanopartículas, midiendo los cambios en la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. En resumen, se trataron células con una confluencia del 90-100%, que se sembraron en placas de 96 pocillos 24 horas antes, con diferentes concentraciones de cada tipo de nanopartículas y compuestos (previamente disuelto en agua) en medio de cultivo celular durante 24h (100 µL/pocillo). A continuación, los tratamientos se reemplazaron por medio de cultivo celular fresco (100 µL) con 0,5 mg/mL de MTT (a partir de disoluciones concentradas 10 veces). Las células se incubaron después durante 2 horas adicionales, se retiró cuidadosamente el medio y se disolvió el producto de formazan (estado reducido del nitroazul de tetrazolio) coloreado en 100 µL de DMSO y se midió a 570 nm (corregido a 620 nm) con un lector de microplacas de absorción Omega SPECTROstar® (BMG LABTECH, Alemania). La densidad óptica se correlacionó directamente con la cantidad de células y se expresó en porcentajes con respecto al grupo de control (células no tratadas). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran como media de porcentaje y su error como desviación estándar (sd) de tres experimentos diferentes.

**2.2.9. Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos de los ensayos para determinar la actividad biológica de cada una de las formulaciones fueron, cuando la cantidad de estas era suficiente, analizados estadísticamente mediante el uso de ANOVA de una o dos vías (dependiendo del número de variables del experimento en cuestión) tras comprobar que la distribución de los datos era normal. Para ambos ANOVAs se aplicaron comparaciones múltiples de Bonferroni post-prueba. Tanto para graficar estos datos, así como para su análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism v5.







## **Resultados y discusión**





### 3. Resultados y discusión

En esta sección, se expondrán los resultados obtenidos en la fabricación de nanopartículas de PMVEMA-ES y su caracterización morfológica incluyendo la presencia de diferentes componentes: polielectrolitos emisores de luz (azul y roja) y/o antibióticos de ámbito hospitalario. Estos materiales nanoestructurados se estudiarán y evaluarán en diversos ensayos biológicos, como localización celular, toxicidad y actividad antimicrobiana.

#### 3.1. Caracterización de las nanopartículas (NPs) de PMVEMA-ES con y sin polielectrolitos

##### 3.1.1. Espectroscopia de correlación de fotones (“dynamic light scattering”; DLS)

Las nanopartículas de PMEVEMA-ES obtenidas por el método de desplazamiento de disolvente (ver metodología sección 1.1) han sido caracterizadas por su tamaño y potencial zeta mediante espectroscopia de correlación de fotones con el equipo Brookhaven 90 Plus, midiendo a 90°. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en función de la concentración de polímero transportador, para una concentración constante de polielectrolito conjugado o emisor. Con esta técnica tan sensible y fácil de utilizar, se ha comprobado la homogeneidad y estabilidad de las muestras en función de concentraciones variables de PMVEMA-ES desde 1,25 hasta 26,6 mg/mL, correspondiente con la concentración máxima del polímero comercial incluido en las preparaciones.

En general, se aprecia cómo a menor cantidad de polímero comercial, disminuye el tamaño de las nanopartículas. Si pasamos a relacionar los tamaños de las NPs dentro de la misma cantidad de

polímero PMVEMA-ES entre las NPs con y sin polímeros fluorescentes, se observa que al incluir los polielectrolitos aumenta su tamaño, excepto a la máxima concentración.

**Tabla 5.** Tamaños y potenciales zeta (PZ) de nanopartículas (NPs) con diferentes cantidades de PMVEMA-ES, con y sin polielectrolito conjugado (PC)<sup>a</sup>.

NPs		Tamaño±sd <sup>b</sup> (nm)	PDI±sd <sup>b,c</sup>	PZ±sd <sup>b</sup> (mV)
PMVEMA-ES (mg/mL)	PC <sup>a</sup>			
26,6	PFP <sup>+</sup>	290±9	0,08±0,04	-30±5
	PFNT <sup>+</sup>	282±21	0,10±0,02	-30±22
20	PFP <sup>+</sup>	286±7	0,23±0,07	-29±10
	PFNT <sup>+</sup>	252±2	0,11±0,03	-38±8
10	PFP <sup>+</sup>	211±21	0,14±0,07	-27±13
	PFNT <sup>+</sup>	194±16	0,15±0,06	-28±11
5	PFP <sup>+</sup>	175±17	0,15±0,07	-18±12
	PFNT <sup>+</sup>	169±13	0,14±0,01	-10±3
2,5	PFP <sup>+</sup>	142±14	0,11±0,02	-22±3
	PFNT <sup>+</sup>	155±4	0,13±0,02	-30±5
1,25	PFP <sup>+</sup>	160±16	0,23±0,05	-28±8
	PFNT <sup>+</sup>	98±18	0,25±0,11	-11±7

<sup>a</sup> PC= PFP<sup>+</sup> (azul) ó PFNT<sup>+</sup> (rojo); [PC]= 1,50 μM (constante).

<sup>b</sup> El error se ha expresado como la desviación estándar de una población de al menos n=3.

<sup>c</sup> PDI es la polidispersión del tamaño medido en las nanopartículas.

A la concentración más alta de polímero comercial sin ningún tipo de aditivo, el tamaño de las NPs es el más alto, aproximadamente 350 nm, sin embargo, disminuye ligeramente hasta los 300 nm con la adición de los polielectrolitos. Por otro lado, a la concentración más baja (1,25 mg/mL) se obtiene valores dispares cuando se incorpora un polielectrolito. Es probable, que las nanopartículas al ser más pequeñas y con una menor cantidad de polímero transportador, la capacidad para albergar la misma cantidad de polielectrolito se vea alterada, no siendo capaz de incorporarlo en su totalidad. Por lo tanto, ambos extremos, el primero por exceso de tamaño y falta de correlación entre material adicionado y tamaño y el segundo caso por falta de material, se descartan como concentraciones a reproducir en la preparación de nanopartículas poliméricas de PMVEMA-ES.

Para concentraciones del polímero transportador entre 20-2,5 mg/ml encontramos tamaños que oscilan entre 150-250 nm, y se aprecia una tendencia lógica del tamaño medido en función de la cantidad de la carga incluida. Esta tendencia estaría también de acuerdo con la capacidad de carga de la nanopartícula que permite añadir otras sustancias sin modificar en exceso el tamaño de la partícula, como se ha visto previamente en la preparación de nanopartículas poliméricas análogas<sup>131</sup>.

La polidispersión (PDI) es una medida de la homogeneidad de las poblaciones. Según las especificaciones del equipo, un valor de PDI inferior a 0,2 es indicativo de una población homogénea. Atendiendo a este criterio, hay mucha homogeneidad entre las poblaciones preparadas, con la excepción de las nanopartículas con la mínima cantidad de polímero comercial y con ambos polielectrolitos. Esto coincide con el aumento desproporcionado de tamaño al incorporar el polielectrolito. La explicación de estos resultados se podría justificar

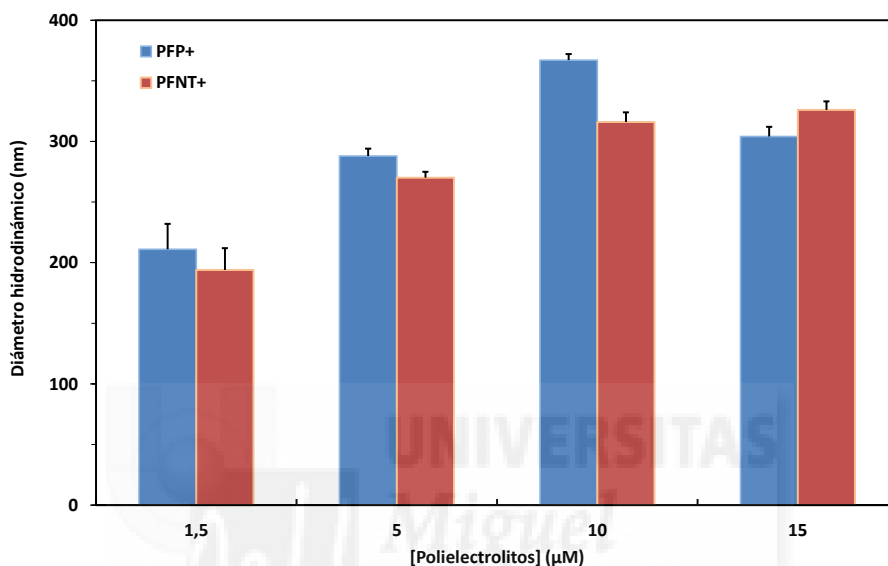
por la aparición de agregados de NPs. donde los polielectrolitos fuesen los conectores, mínimamente recubiertos por el polímero transportador.

Por último, el potencial zeta es una medida de la magnitud electrostática de la doble capa interfacial de una partícula con su entorno. El signo entre cargas de las partículas corresponde a la atracción (positivo) o repulsión (negativo) entre las cargas y es uno de los parámetros clave a tener en cuenta de cómo se afecta la estabilidad de los coloides o NPs. La magnitud del potencial zeta nos indica el grado de estabilidad eléctrica, valores bajos o cercanos al cero indican que las partículas tienden a precipitar mientras que valores altos del potencial en valor absoluto indican estabilidad y que se resistirán a la agregación<sup>132</sup>.

Las nanopartículas de PMVEMA-ES con concentraciones de 20 y 10 mg/mL, presentan los valores de potencial zeta más altos y, por tanto, los que aportan mayor estabilidad como medios dispersos. Estos resultados son parecidos en signo y en valor con nanopartículas compuestas de mono ésteres (de metilo C1 a butilo, C4) de poli-(metil vinil éter-alt-anhídrido maleico), siguiendo un procedimiento de fabricación análogo al descrito aquí<sup>94</sup>. A partir de los valores anteriores, la preparación de nanopartículas con una concentración de 10 mg/mL de PMVEMA-ES se elige como la más adecuada por su buena reproducibilidad lote a lote, estabilidad y menor cantidad de polímero empleado.

Una vez valorada la cantidad óptima de polímero transportador comercial a emplear se variaron las cantidades de polielectrolito conjugado añadido a la preparación de las nanopartículas. La adición de los polímeros fluorescentes oscila entre 0,01% y 0,12% peso/peso con respecto al polímero transportador PMVEMA-ES o entre 1,5 y

15  $\mu\text{M}$  de cada polielectrolito (calculado sobre cada unidad monomérica) y se han estudiado los mismos parámetros químico-físicos por DLS, que los anteriormente descritos.



**Figura 12:** Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de PMVEMA-ES (10 mg/mL) con diferentes concentraciones de polielectrolitos.

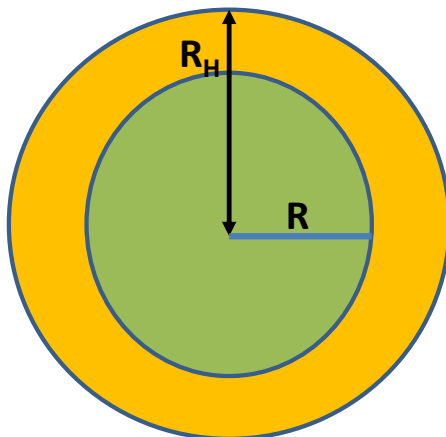
En la figura 12, se representan los resultados de la adición de ambos polielectrolitos catiónicos (PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>) y se puede apreciar como a mayor cantidad de cualquiera de los dos polielectrolitos aumenta el tamaño de las nanopartículas hasta superar los 300 nm cuando la concentración de polielectrolito conjugado está por encima de 10  $\mu\text{M}$ . En todas las muestras, la polidispersión se mantiene inalterada con valores promedio  $0,17 \pm 0,07$ . En relación a los potenciales zeta, todos los valores se conservan con datos negativos para las distintas formulaciones, y el promedio es de  $-25 \pm 6$  mV. Esto nos indica la poca influencia que presenta la adición de las cantidades

estudiadas de polímero conjugado como sonda fluorescente en la estabilidad de las nanopartículas. Por tanto, se obtienen poblaciones fluorescentes, estables y poco dispersas para su uso en posteriores ensayos biológicos.

Como resumen, la relación óptima para la preparación de las nanopartículas es: 10 mg/mL de PMVEMA-ES y 1,50  $\mu$ M de polielectrolitos catiónicos. El tamaño hidrodinámico de estas nanopartículas se encuentra alrededor de 200-220 nm, rango de valores apropiados para traspasar algunas barreras o membranas celulares de interés biológico<sup>111,133,134</sup>. La cantidad de polielectrolito conjugado será añadida en función de la cantidad necesaria para emplearse como sonda de fluorescencia o para ejercer una actividad antimicrobiana y no se necesitaría alcanzar cantidades que podrían causar daño celular, ni tampoco encarecer la producción de estas nanopartículas.

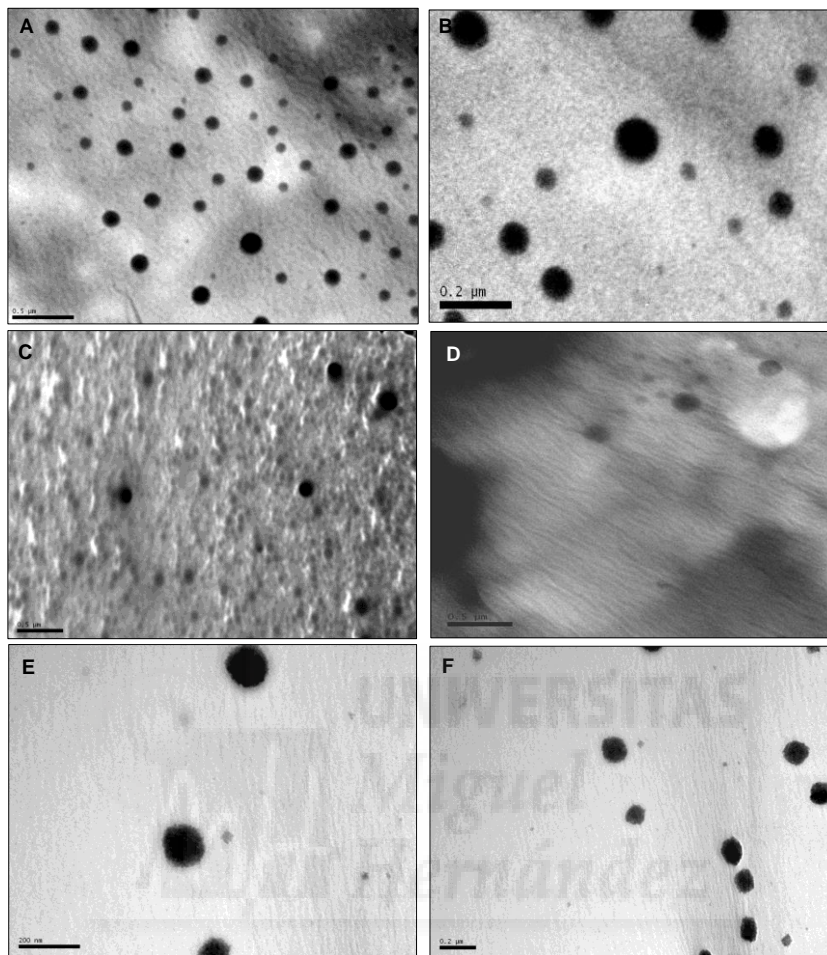
### **3.1.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)**

Con el fin de estudiar la morfología de las nanopartículas y comparar el tamaño de la medida de tamaño realizada con la técnica anterior se utilizó el microscopio electrónico de transmisión.



**Figura 13:** Esquema de una nanopartícula señalizando el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) medido por DLS y el radio ( $R$ ) medido por TEM.

La disminución de los tamaños de las nanopartículas al medir con TEM se debe a que con el microscopio electrónico de transmisión se mide el diámetro real de la nanoestructura (verde en la figura) mientras que el equipo de correlación de fotones mide el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas (naranja en la figura). El diámetro hidrodinámico se debe a una medida de la partícula en medio líquido que se está moviendo y la mayoría de veces se adhiere a una capa eléctrica dipolar a su superficie. Por otra parte, esta medida está sujeta a la precisión del equipo dependiendo de las diferentes poblaciones de nanopartículas fabricadas.

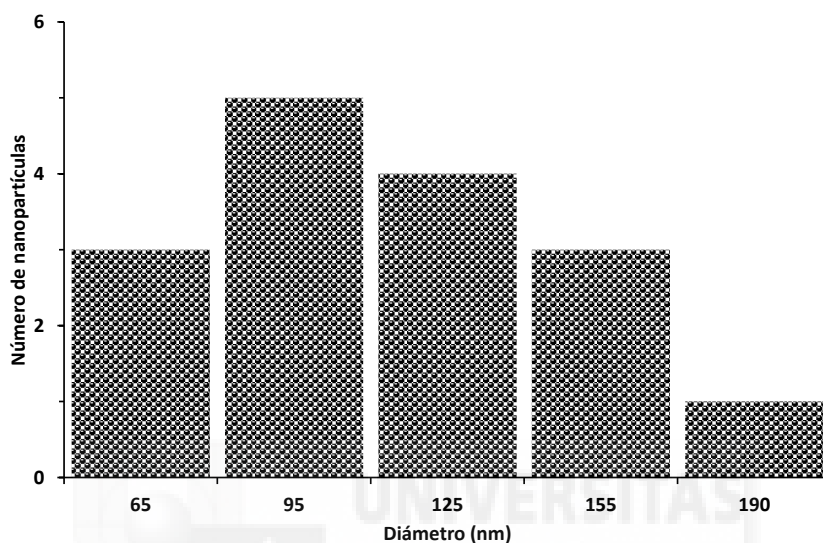


**Figura 14:** Nanopartículas de PMVEMA-ES 10 mg/mL. A) y B) NPs PMVEMA 10 mg/mL (Escala: 500 nm y 200 nm). C) con 1,5  $\mu\text{M}$  de PFP<sup>+</sup> (Escala: 500 nm). D) con 1,5  $\mu\text{M}$  de PFNT<sup>+</sup> (Escala: 500 nm). E) con 15  $\mu\text{M}$  de PFP<sup>+</sup> (Escala: 200 nm). F) con 15  $\mu\text{M}$  de PFNT<sup>+</sup> (Escala: 200 nm).

En la figura anterior, las nanopartículas presentan una disminución de tamaño con respecto a las medidas realizadas por DLS en cualquiera de las concentraciones vistas en las imágenes fotográficas. Como muestra representativa de las poblaciones visualizadas en la fotografía A, figura 13, se ha confeccionado el



histograma (figura 14) que representan la media de poblaciones registrada en la preparación de NPs de PMVEMA-ES 10 mg/mL



**Figura 15:** Histograma de NPs de PMVEMA-ES 10 mg/mL sin carga.

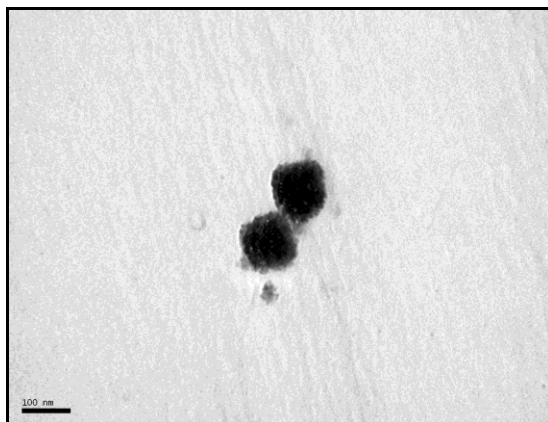
Las muestras de NPs sin cargar o cargadas de polielectrolitos a concentración 1,5 $\mu$ M ó 15  $\mu$ M de PFP<sup>+</sup> o PFNT<sup>+</sup> y realizados con esta técnica de microscopía electrónica de transmisión se han analizado de forma particular, fotograma a fotograma con el mayor número posible de partículas. Los resultados se muestran en la tabla 6 y todas presentan morfología esférica.

**Tabla 6:** Diámetros promedios obtenidos por TEM y DLS en las muestras de NPs de PMVEMA-ES 10 mg/mL con diferente composición.

Composición de NPs		$D_h$	$D_{TEM}$	$D_h/D_{TEM}$	Observaciones TEM
PMVEMA-ES	[PC <sup>+</sup> ]	(nm)	(nm)		
	-	202±11	114±37	1,77	Multimodal; n=16 (95 y 125 nm)
+ PFP <sup>+</sup>	1,5 μM	211±21	181±41	1,17	Bimodal; n= 16 (200 y 125 nm)
+ PFNT <sup>+</sup>		194±16	217±29	0,89	Bimodal; n= 6 (250 y 200 nm)
+ PFP <sup>+</sup>	15 μM	304±8	194±56	1,55	Bimodal; n= 6 (255 y 165 nm)
+ PFNT <sup>+</sup>		326±7	256±50	1,27	Bimodal <sup>1</sup> ; n=12 (330 y <b>230</b> nm)

<sup>1</sup> En negrita se indica población mayoritaria.

Las muestras que contienen bajas concentraciones de polielectrolito presentan dos poblaciones diferentes en microscopía de transmisión de electrones, cuyo diámetro se asemeja a los obtenidos por DLS, mientras que a alta concentración de polielectrolito, el tamaño aumenta de forma significativa. Este hecho puede deberse a la presencia de nanopartículas agregadas que se forman cuando hay una alta cantidad de polímero transportador o simplemente donde los polielectrolitos ayudan a conectarse entre las partículas formadas, como se aprecia en la figura siguiente, donde dos nanopartículas con diámetros similares se agregan y se comportan como una partícula de diámetro mayor.



**Figura 16:** Imagen del TEM de NPs PMVEMA-ES 10 mg/mL con 15  $\mu$ M de PFP<sup>+</sup> (Escala: 100 nm).

### 3.2 Caracterización de las NPs de PMVEMA-ES con y sin antibióticos y/o polielectrolitos

Después de evaluar los resultados de los diferentes tamaños de muestras de NPs con y sin polielectrolitos conjugados, se decidió incluir en las nanopartículas antibióticos de uso hospitalarios con el fin de evaluar su efecto en ensayos de actividad antimicrobiana. En este caso, las nanopartículas seleccionadas para la elaboración con antibióticos fueron las compuestas por 10 mg/mL de PMVEMA-ES y 15  $\mu$ M de polímeros conjugados que presentaban tamaños de 305-325 nm según diámetro hidrodinámico y 195-255 nm de TEM.

### 3.2.1 Espectroscopia de correlación de fotones (DLS) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Empleando la misma metodología de fabricación y caracterización de las nanopartículas anteriores, se procedió a incluir diferentes antibióticos a una concentración característica 0,2 mg/mL. Esta concentración fue seleccionada para ajustar las dosis por dilución necesaria en los cálculos de ensayos biológicos de actividad antimicrobianas. En la siguiente tabla, se muestran las características físico-químicas de las nanopartículas cargadas con antibiótico obtenidas con DLS y se incluye la eficiencia de la encapsulación del contenido en fármaco, obtenida mediante análisis cromatográfico por HPLC para cada formulación.



**Tabla 7:** Tamaños ( $R_H$ ), polidispersiones (PDI), potenciales zeta (PZ) y eficacia de encapsulación (EE) de nanopartículas de PMVEMA-ES (10 mg/mL) con diferentes antibióticos a concentración (0,2 mg/mL), con o sin polielectrolito conjugado (15  $\mu$ M).

<b>NPs</b>	<b>Tamaño<math>\pm</math>sd<sup>a</sup></b>	<b>PDI<math>\pm</math>sd<sup>a</sup></b>	<b>PZ<math>\pm</math>sd<sup>a</sup></b>	<b>EE <math>\pm</math>sd<sup>a,b</sup></b>
<b>PMVEMA-ES</b>	<b>(nm)</b>		<b>(mV)</b>	<b>(%)</b>
<b>Blancas<sup>c</sup></b>	195 $\pm$ 7	0,15 $\pm$ 0,04	-38 $\pm$ 13	
<b>Amikacina</b>	253 $\pm$ 5	0,17 $\pm$ 0,07	-39 $\pm$ 2	14 $\pm$ 4
<b>Amikacina-PFP<sup>+</sup></b>	317 $\pm$ 6	0,31 $\pm$ 0,03	-25 $\pm$ 3	24 $\pm$ 1
<b>Amikacina-PFNT<sup>+</sup></b>	258 $\pm$ 8	0,27 $\pm$ 0,14	-16 $\pm$ 2	32 $\pm$ 11
<b>Neomicina</b>	209 $\pm$ 4	0,20 $\pm$ 0,07	-29 $\pm$ 7	40 $\pm$ 3
<b>Neomicina -PFP<sup>+</sup></b>	166 $\pm$ 1	0,15 $\pm$ 0,08	-21 $\pm$ 2	51 $\pm$ 4
<b>Neomicina -PFNT<sup>+</sup></b>	300 $\pm$ 7	0,09 $\pm$ 0,04	-42 $\pm$ 4	30 $\pm$ 5
<b>Cefotaxima</b>	156 $\pm$ 6	0,29 $\pm$ 0,03	-31 $\pm$ 8	69 $\pm$ 7
<b>Cefotaxima-PFP<sup>+</sup></b>	157 $\pm$ 2	0,17 $\pm$ 0,05	-26 $\pm$ 8	66 $\pm$ 4
<b>Cefotaxima-PFNT<sup>+</sup></b>	211 $\pm$ 6	0,17 $\pm$ 0,04	-18 $\pm$ 4	66 $\pm$ 6
<b>Ciprofloxacino</b>	256 $\pm$ 8	0,17 $\pm$ 0,01	-16 $\pm$ 3	59 $\pm$ 8
<b>Ciprofloxacino-PFP<sup>+</sup></b>	151 $\pm$ 3	0,19 $\pm$ 0,07	-24 $\pm$ 11	46 $\pm$ 11
<b>Ciprofloxacino-PFNT<sup>+</sup></b>	135 $\pm$ 5	0,14 $\pm$ 0,03	-21 $\pm$ 5	45 $\pm$ 12

<sup>a</sup> El error se expresa como la desviación estándar de poblaciones con n=3 medidas de dos lotes distintos como mínimo.

<sup>b</sup> Eficacia de Encapsulación promedio es el cociente entre antibiótico retirado respecto del total y expresado en tanto por ciento, de al menos tres inyecciones para cada muestra y lote.

<sup>c</sup> Blancas se refiere a las nanopartículas compuestas de solo polímero transportador (sin carga).

En todos los casos, las poblaciones son reproducibles y poco dispersas, según la polidispersión obtenida, con excepción de nanopartículas cargadas con el aminoglucósidos de amikacina y polielectrolitos conjugados que tiene unos valores superiores a 0,2. Los diámetros más grandes medidos son para las nanopartículas cargadas con aminoglucósidos: amikacina (255-315 nm) y neomicina (165-300 nm). Las que contenían ciprofloxacino presentaban unos valores que oscilaron entre 135-256 nm y fueron muy parecidos para nanopartículas cargadas con cefotaxima que se mostraron ente 156-211 nm.

En cuanto a los potenciales zeta, todos ellos siguen siendo negativos, alrededor de los mismos valores que cuando las nanopartículas no están cargadas con antibióticos, por tanto, cabe esperar que no se haya afectado a la capa externa de la nanoestructura, aunque algunos autores justifican pequeñas variaciones debido al carácter hidrofílico de cada antibiótico<sup>135</sup>. La estabilidad de la dispersión en todos los casos es moderada siendo en general más favorables con los aminoglucósidos.

En la tabla no destacan resultados al adicionar diferentes antibióticos en la preparación de las NPs y no siguen una pauta establecida por la polarizabilidad, impedimento estérico o volumen específico del medicamento añadido. Los tamaños registrados comprenden valores entre 135 y 300 nm, en radios hidrodinámicos, que se traducirían en poblaciones reales inferiores a 200 nm. La presencia de los polielectrolitos catiónicos en el procesado de las nanopartículas juega un papel distinto en cada caso y sin ninguna pauta clara. Con cefotaxima y ciprofloxacino se afectan mínimamente tanto en el tamaño como en la estabilidad, al igual que ocurría con las nanopartículas blancas de PMVEMA-ES (10 mg/mL) y 1,5  $\mu$ M de

polielectrolitos (tabla 5). Con neomicina tienden a compactarse los tamaños con la adición de PFP<sup>+</sup> mientras que el efecto contrario surge al adicionar PFNT<sup>+</sup>. Por su parte, las nanopartículas cargadas con amikacina incrementan los tamaños como ya ocurría en altas concentraciones de polielectrolitos conjugados (ver figura 11). En el caso de nanopartículas de amikacina, este aumento de tamaño se ha observado previamente en un estudio realizado con el copolímero de ácidos láctico y glicólico (PLGA, 50:50) al que adicionan dos concentraciones de polímero estabilizante (pluronic F68)<sup>120</sup>. Aquí se justifica que a baja concentración de estabilizante F68 se produce un aumento del tamaño de la partícula como consecuencia de un incremento de la tensión superficial y de la diferente viscosidad y difusión del medicamento durante el proceso de formación de las nanopartículas. En general, se esperaba que el aumento de la relación polímero transportador medicamento produjese un aumento en la cantidad almacenada de medicamento por unidad de masa de nanopartícula y en la eficiencia de encapsulación, si bien estas concentraciones empleadas nos han permitido ajustar los ensayos biológicos.

El desarrollo del estudio de encapsulación se llevó a cabo analizando los diferentes cromatogramas de los distintos lotes de cada antibiótico en las diferentes formulaciones de PMVEMA-ES. La eficacia de encapsulación (EE%) promedio de las distintas nanopartículas cargadas con los diferentes antibióticos se evaluó mediante la técnica de cromatografía de líquidos y sus protocolos analíticos descrita en la sección 2.2.6 de materiales y métodos de este capítulo (tabla 2).

En la columna correspondiente de la tabla 7, destaca que el antibiótico betalactámico (cefotaxima) presenta los valores de

encapsulación más altos por encima del 65% mientras que la quinolona (ciprofloxacino) se encapsula entre el 45-60%. Los aminoglucósidos se incorporan en el interior de las nanopartículas de modo menos eficiente, neomicina presentó unos valores entre 30-50% y la amikacina inferiores al 32%. La diferencia observada entre los distintos antibióticos probados se puede deber a que los aminoglucósidos poseen mayores pesos moleculares y un mayor volumen específico que los otros dos antibióticos, ciprofloxacino y cefotaxima. Además, las estructuras químicas de la quinolona y el betalactámico son planas lo que nos podrían indicar que presentan probablemente un empaquetamiento más compacto del propio medicamento que ayude a optimizar su carga en el interior de la nanocápsula y así obtener una mayor carga de fármaco en el interior de la nanoestructura.

En todos los casos se mantienen inalterados los tiempos de retención de los antibióticos en las nanopartículas en comparación con los antibióticos en solución. Tampoco se observaron otros picos debidos a degradación de las muestras o nuevos compuestos y las cantidades fueron medidas previa calibración de muestras recientes.

### **3.3. Espectroscopia de fluorescencia**

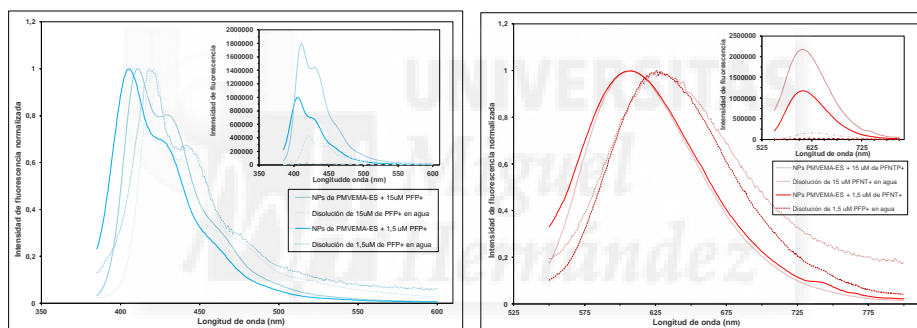
Con el fin de ser empleados como sondas fluorescentes en bioimagen, las nanopartículas cargadas con los polielectrolitos conjugados fueron analizadas por fluorimetría en disolución acuosa. En este estudio se ha comprobado el rendimiento de fluorescencia en estado estacionario de las nanopartículas con PFP<sup>+</sup> (polielectrolito emisor azul) y PFNT<sup>+</sup> (polielectrolito emisor rojo) y se ha comparado con los polielectrolitos en medio acuoso, evaluando la estabilidad en el tiempo de estas muestras y el efecto que produce sobre la



fluorescencia de cada polielectrolito la presencia de los antibióticos incorporados en las nanopartículas.

### 3.3.1. Espectroscopia de fluorescencia de nanopartículas cargadas con los polielectrolitos conjugados

En la siguiente figura se registraron los espectros de fluorescencia de PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> directamente en medio acuoso y dentro de las nanopartículas a dos concentraciones molares (1,5 y 15  $\mu\text{M}$ ) y a temperatura ambiente.



**Figura 17:** Espectros de intensidad de fluorescencia normalizados de NPs cargadas y en disolución acuosa a  $[\text{PC}^+] = 1,5$  y  $15 \mu\text{M}$ . A) PFP<sup>+</sup> ( $\lambda_{\text{ex}}$ :380 nm) y B): PFNT<sup>+</sup> ( $\lambda_{\text{ex}}$ :510 nm). En los gráficos insertos se muestra los espectros de intensidad de fluorescencia.

En ambos casos, destaca que ambos polímeros conjugados presentan una intensidad de fluorescencia mucho mayor dentro de las nanopartículas que rodeados del ambiente acuoso. Uno de los efectos más estudiados con anterioridad en nuestro grupo y colaboradores es la rápida formación de agregados de estos polielectrolitos en medios acuosos<sup>63,64,66,68,136-139</sup>. En particular, el polielectrolito PFP<sup>+</sup> ha sido empleado en multitud de aplicaciones debido al desplazamiento de las

longitudes de onda del máximo de emisión como consecuencia del entorno del polielectrolito conjugado. Esta sensibilidad se amplifica como consecuencia de un estiramiento conformacional de las cadenas principales que permite una conjugación más efectiva y un aumento significativo de su rendimiento cuántico de fluorescencia cuando tiene un buen disolvente<sup>140</sup>. En las figuras anteriores se aprecia de nuevo que las NPs que contienen PFP<sup>+</sup>, independientemente de la concentración de PC, aumentan significativamente la fluorescencia, pero además hay un desplazamiento del máximo de emisión de 10 nm hacia longitudes de onda menores. Las NPs favorecen la conformación fluorescente del polielectrolito como ocurre en presencia de buenos disolventes como pueden ser las mezclas de propanol/agua (3:2), o directamente en etanol, metanol, DMSO con longitudes de onda en el máximo de 406 nm mientras que en medio acuo o tamponado están sobre 420 nm<sup>141</sup>. Al comparar los resultados de las NPs de PFNT<sup>+</sup>, en primer lugar, destaca que el desplazamiento del máximo de emisión en este caso es de 24 nm, y con un efecto hipsocrómico respecto del agua (igual que anterior polielectrolito), que en PFNT<sup>+</sup> no había sido observado con anterioridad. Con estas NPs se alcanza el rendimiento cuántico más elevado con respecto a otros medios estudiados en nuestro grupo<sup>141</sup>. En la siguiente tabla se resumen los valores más significativos encontrados con estos polielectrolitos.

**Tabla 8.** Longitud de onda en el máximo de emisión (nm) y rendimiento cuántico de polielectrolitos en diferentes medios.

PC <sup>+</sup>	PFP <sup>+</sup>			PFNT <sup>+</sup>			
Solvente PC	Agua	Propanol : agua (3:2)	NPs PMVEMA -ES	Agua	EtOH	NPs PMVEMA -ES	DOPC
$\lambda_{em}$ (nm)	420	406	408	635	645	607	635
$\Phi$	0,16	0,75	0,67	0,01	0,17	0,19	0,14

El entorno de los polielectrolitos encapsulados en NPs de PMVEMA-ES favorece la definición del espectro de fluorescencia lo que indica un entorno favorable y, además, se ha comprobado que las muestras mantenidas en oscuridad al cabo de tres meses mantienen los altos valores de fluorescencia, por lo que su almacenaje y estabilidad fotoquímica se mejora como consecuencia de la encapsulación con estas formulaciones.

Por tanto, las nanoestructuras formadas por polímero comercializado encapsulando polielectrolitos fluorescentes (0,1-0,01%) son mejores para estabilizar fotoquímicamente y poder producir fluorescencia efectiva en medio acuoso y entornos biológicos que los polímeros conjugados libres. Este resultado, tiene concordancia con los obtenidos por Zehra y colaboradores<sup>88</sup> en el que incorporaban el PFNT<sup>+</sup> dentro de liposomas con el fin de estabilizar el polielectrolito y se observó que efectivamente a mayor cantidad de vesículas lipídicas, mayor era la fluorescencia emitida por el PFNT<sup>+</sup>. Los datos de fluorescencia presentados por los liposomas en su mayor concentración (1 mM) fueron de 48 unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia para una concentración de PFNT<sup>+</sup> de 1,5

$\mu\text{M}$  y su valor de rendimiento cuántico es ligeramente inferior (0,14) al presentado en las nanopartículas (0,19). La longitud de onda de los liposomas en su máximo de emisión rondaba los 630 nm frente a los 607 nm que presenta el polielectrolito conjugado dentro de las nanopartículas. Estos datos confirman que la encapsulación del polímero conjugado en una nanopartícula de PMVEMA-ES le confiere una conformación más estable que la presentada en liposomas.

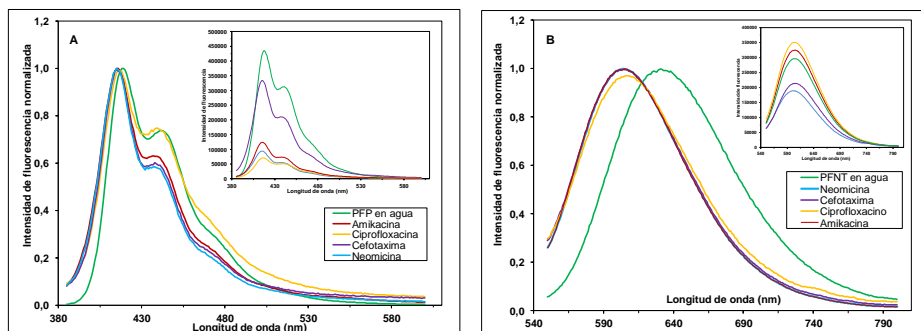
### **3.3.2. Espectroscopia de fluorescencia de nanopartículas cargadas con los polielectrolitos conjugados y distintos antibióticos**

Obtenidos los valores anteriores, se realizó la espectroscopia de fluorescencia a las nanoestructuras cargadas con antibióticos para evaluar si la incorporación de los antimicrobianos afectaba a esta caracterización.

En la figura 18 se representaron los espectros normalizados de fluorescencia del PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> tanto en medio acuoso a 15  $\mu\text{M}$  como dentro de las nanopartículas a la misma concentración y cargadas a una concentración de 0,2 mg/mL de los diferentes antibióticos.

En ambos espectros normalizados destaca que las nanopartículas de PMVEMA-ES con 15  $\mu\text{M}$  de polielectrolitos conjugados siguen siendo más estables que los polielectrolitos en medio acuoso aun a pesar de contener en su interior los diferentes antibióticos. Esta estabilidad es más destacable con el polielectrolito emisor rojo con un desplazamiento del máximo de emisión de 33 nm frente al desplazamiento del polielectrolito emisor azul con un valor de 25 nm. Este hecho quiere decir, que el PFNT<sup>+</sup> presenta una conformación de cadenas más estiradas y estables dentro de las

nanopartículas, fenómeno que comparte con el PFP<sup>+</sup> aunque éste menos destacable. Por tanto, la incorporación de las moléculas de fármaco a las nanoestructuras realizadas en este capítulo, no afecta a la estabilidad de los polielectrolitos.



**Figura 18:** Espectros de intensidad de fluorescencia normalizados de NPs cargadas a  $[PC^+] = 15 \mu\text{M}$  y  $0,2 \text{ mg/mL}$  de diferentes antibióticos. A) PFP<sup>+</sup> ( $\lambda_{\text{ex}}$ :380 nm). B) PFNT<sup>+</sup> ( $\lambda_{\text{ex}}$ :510 nm). En los gráficos insertos se muestran los espectros de fluorescencia absolutos.

Aunque la estabilidad de los sistemas nanoestructurados se mantiene, en ambos polímeros conjugados en este tipo de nanopartículas con antibióticos presentan en casos de una intensidad de fluorescencia inferior a la del polielectrolito en medio acuoso, desactivación de la fluorescencia (efecto quenching). En el caso del polielectrolito emisor azul se afecta a los cuatro tipos de nanopartículas, mientras que, en el polielectrolito emisor rojo, únicamente afecta a los antibióticos aminoglucósidos. En ambos espectros insertos de nanopartículas cargadas con antimicrobianos, se puede apreciar como la intensidad de fluorescencia de los dos antibióticos aminoglucósidos tienen menor fluorescencia que el

polielectrolito disuelto en agua. Además, en el caso del polielectrolito PFP<sup>+</sup> (figura A inserta), se aprecia una ligera disminución de la fluorescencia por parte de la cefotaxima (betalactámico) y el ciprofloxacino, justo lo contrario que cuando van encapsulados con el polielectrolito PFNT<sup>+</sup> (figura B inserta).

La desactivación generalizada de la fluorescencia podría deberse a reacciones en estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos o desactivación de la fluorescencia por colisiones moleculares. En el caso que nos ocupa, la desactivación de la fluorescencia no parece ser debido a la formación de complejos o reacciones en estado excitado ya que al analizar los cromatogramas por HPLC no se observan cambios en la estructura de las moléculas antibióticas. Por tanto, este efecto será debido o bien a transferencia de cargas o colisiones moleculares.

Brevemente, las nanopartículas de PMVEMA-ES con [PC<sup>+</sup>]= 15  $\mu$ M y cargadas con antibióticos presentan una estabilidad conformacional mayor que el polielectrolito sólo en medio acuoso al igual que las nanopartículas sin antibiótico. Sin embargo, a la hora de actuar como sondas fluorescentes, únicamente en caso de los aminoglucósido encapsulados con PFP<sup>+</sup> podrían utilizarse, ya que en los otros casos hay una desactivación de la fluorescencia.

### **3.4. Estudio de la interacción de los PCs y NPs con muestras biológicas mediante microscopía**

#### **3.4.1. Detección de PCs (solos o en NPs) en muestras biológicas mediante microscopía óptica de fluorescencia**

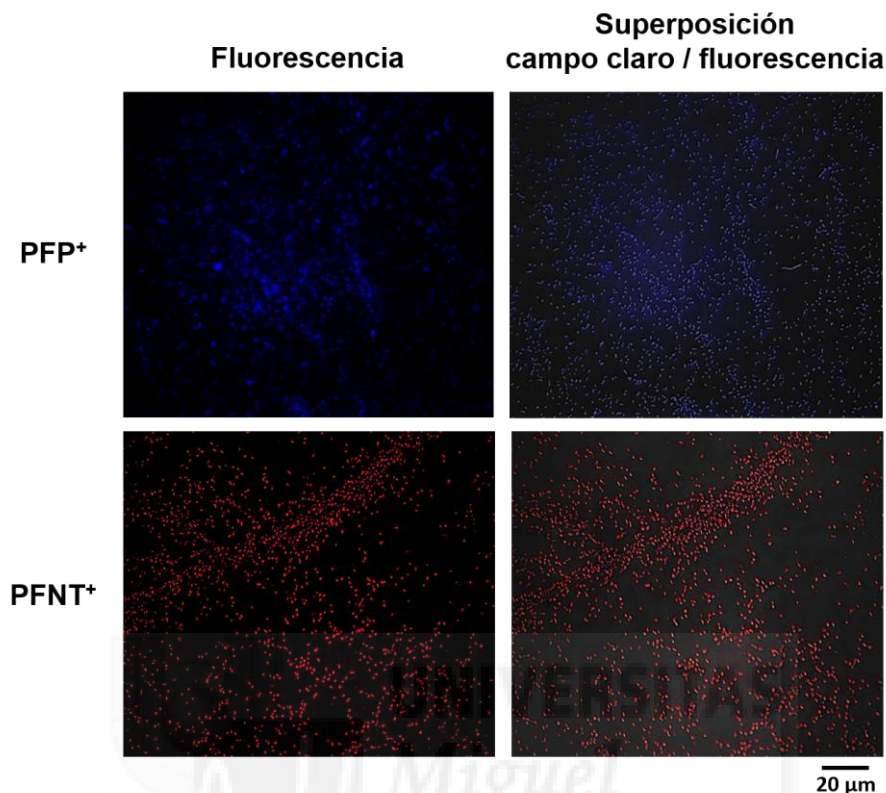
Tras comprobar mediante espectroscopia de fluorescencia el poder emisor de las NPs, se valoró la posibilidad de usarlas para

marcar bacterias ya que, recientemente, se ha comprobado en otros estudios la afinidad por membranas bacterianas de PCs como estos<sup>74</sup> y otros similares<sup>142,143,144,145</sup>. La creación de NPs fluorescentes en sí puede servir como herramienta para el estudio de la biodistribución de nanoparticulados para uso terapéutico como el descrito en esta tesis. Además, dada la afinidad de los PCs por la membrana de procariontas, estos compuestos podrían tener un potencial uso como detector de bacterias, señalizador de focos de infección e incluso agente antimicrobiano.

Para alcanzar este objetivo la visualización del marcaje de los cultivos de bacterias tratados con los PCs se realizó con los equipos de microscopía descritos en el apartado 2.2.3 de material y métodos de este capítulo. (NOTA: Algunos de los resultados mostrados en este apartado forman parte de una publicación en la que el autor de la presente tesis es coautor e intervino directamente en la obtención de dichos resultados).

#### **3.4.1.1. Descripción de la señalización de bacterias y/o células eucariotas con PCs mediante microscopía óptica de fluorescencia**

Para observar el marcaje de bacterias con los PCs objeto de estudio, colonias individuales de *E. coli* (figura 19) y *S. aureus* (figura 20) fueron aisladas de cultivos en placas Petri de LB-agar e incubadas con 100  $\mu$ L de una solución 0,2  $\mu$ M de PC durante 5 minutos, tiempo tras el cual se procedió a su observación en microscopio y toma de imágenes.

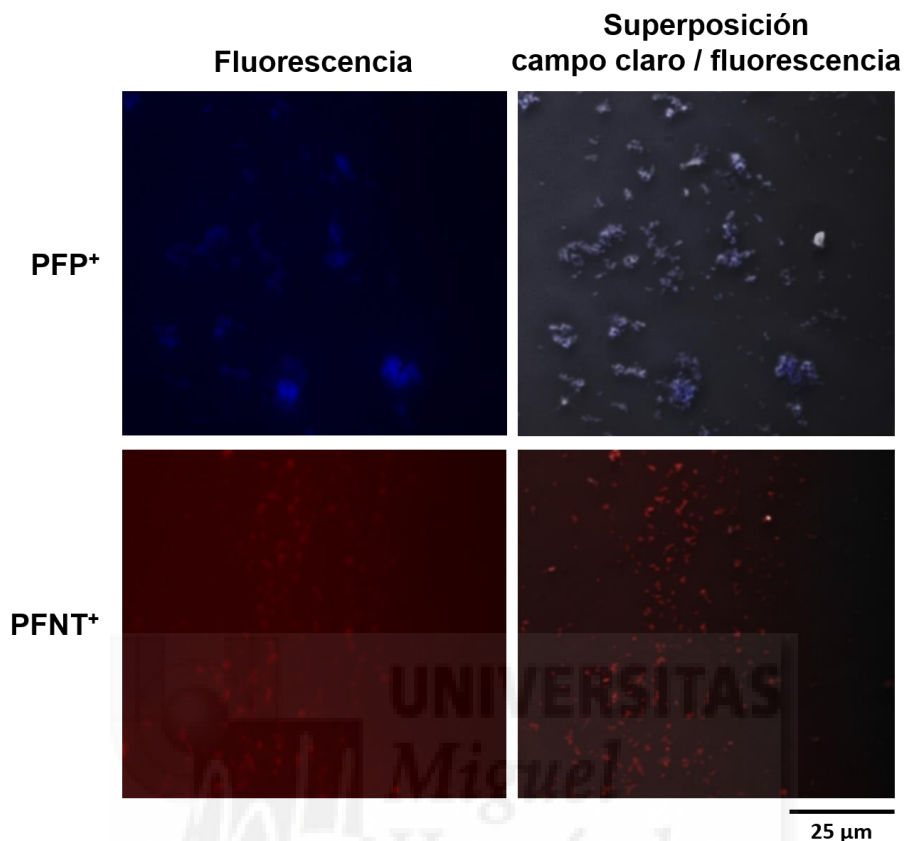


**Figura 19:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de bacterias *E. coli* tras el tratamiento con [0,2 μM] PCs<sup>74</sup>. Las barras son indicadores escalados de tamaño.

En ambos casos se observa colocación de la señal fluorescente del PC correspondiente y la bacteria, de lo que se deduce la unión de estos a algún componente bacteriano probablemente superficial como por ejemplo la membrana o pared celular bacteriano.

Este mismo ensayo se repitió siguiendo la misma metodología con una cepa de *S. aureus* para así comprobar si había diferencias de marcaje entre Gram-positivas y Gram negativas, obteniéndose resultados muy parecidos (figura 20). El componente celular por el que presentan afinidad los PCs debe ser por tanto común a ambos tipos de bacteria.





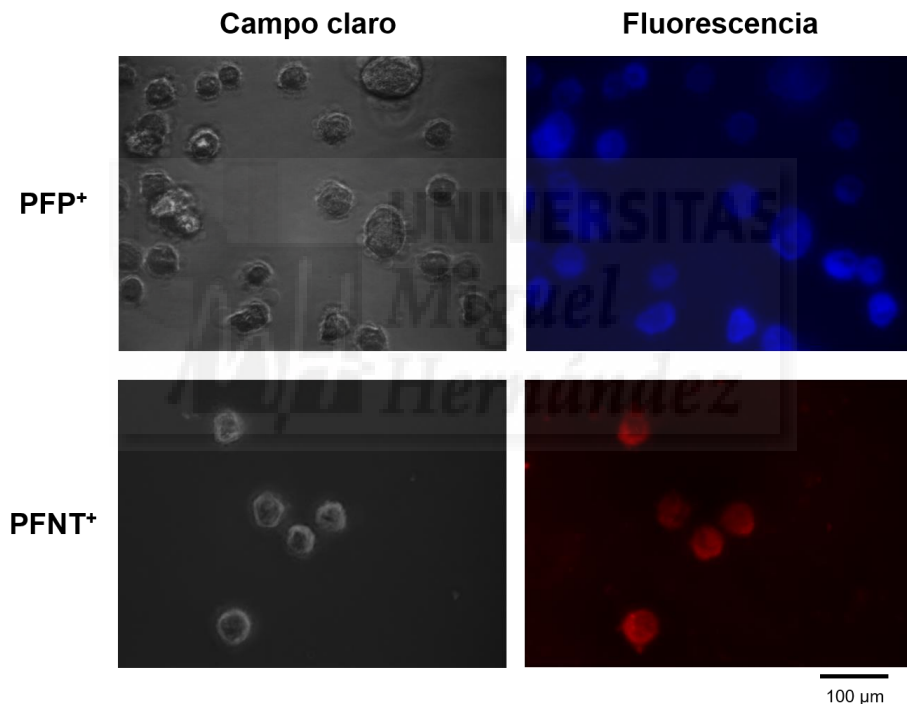
**Figura 20:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de bacterias *S. aureus* tras el tratamiento con [0,2 μM] PCs. Las barras son indicadores escalados de tamaño.

Sin embargo, aunque el marcaje de las bacterias es bastante eficiente a partir de lo observado en las imágenes de las figuras 19 y 20, las posibilidades del uso de los PCs en aplicaciones como señalizador dependerían de la existencia de un marcaje diferencial con respecto a otro tipo de células.

Por lo tanto, en paralelo a los ensayos anteriores, para comparar la afinidad que mostraban los PCs por componentes de

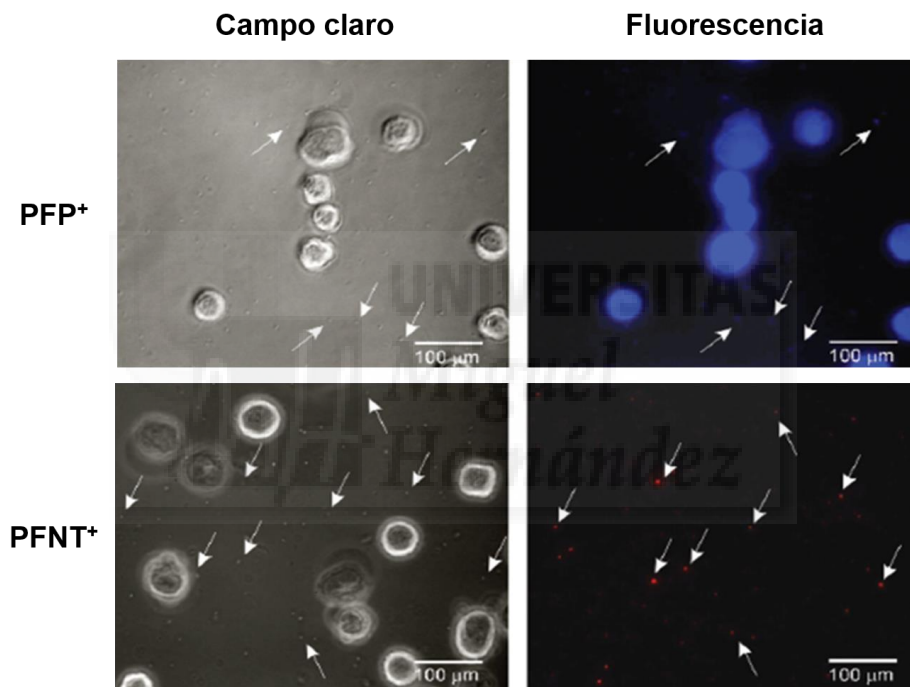
células eucariotas, estos se incubaron, en las mismas condiciones con células HeLa (línea celular de cáncer cérvico-uterino) (figura 21).

Como se observa en la figura 21, los PCs también presentan afinidad por componentes celulares de HeLa. A priori, esto hace suponer que los PCs no son buenos señalizadores bacterianos al unirse también y de forma aparentemente muy eficiente a las células eucariotas utilizadas en este ensayo.



**Figura 21:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa tras el tratamiento de PCs<sup>74</sup>. Misma metodología que para el marcaje bacteriano. Las barras insertadas son indicadores escalados de tamaño.

Sin embargo, para realmente comprobar la selectividad de los PCs por ambos tipos de células se hace necesaria una comparación directa. Por este motivo, mediante este mismo método también se comprobó si había diferencias en el marcaje con PCs entre las *E. coli* y las células eucariotas citadas mediante el tratamiento de un co-cultivo de ambas (figura 22).



**Figura 22:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de un co-cultivo de células humanas HeLa y bacteria *E. coli* tratadas con los PCs<sup>74</sup>. Misma metodología que para el marcaje bacteriano. Las flechas incluidas indican ejemplos de bacterias marcadas. Las barras insertadas son indicadores escalados de tamaño.

Aunque, como veíamos en la figura 21, ambos PCs también tienen afinidad por las membranas de las células HeLa, al combinar bacterias y células el PFNT<sup>+</sup> en concreto presenta mayor afinidad por las primeras al no apreciarse apenas marcaje en las células. En contraposición, el PFP<sup>+</sup> no parece tener mayor afinidad por unas que por otras, al observarlas por el microscopio y en estas condiciones. De esta manera, se confirma que estos PCs presentan afinidad por membranas celulares y en el caso del PFNT<sup>+</sup> preferentemente por las de origen bacteriano (o componentes de estos). Estos resultados fueron descritos en la publicación comentada en la que se presentaron valores de coeficiente de partición del polielectrolito PFNT<sup>+</sup> de dos órdenes de magnitud superior en membranas lipídicas de carácter aniónico frente a los sistemas zwitteriónicos. Este dato confirmó la mayor afinidad del PFNT<sup>+</sup> por las bacterias que el PFP<sup>+</sup> debido a la composición de las membranas de las bacterias frente a la estructura del polielectrolito<sup>74</sup>.

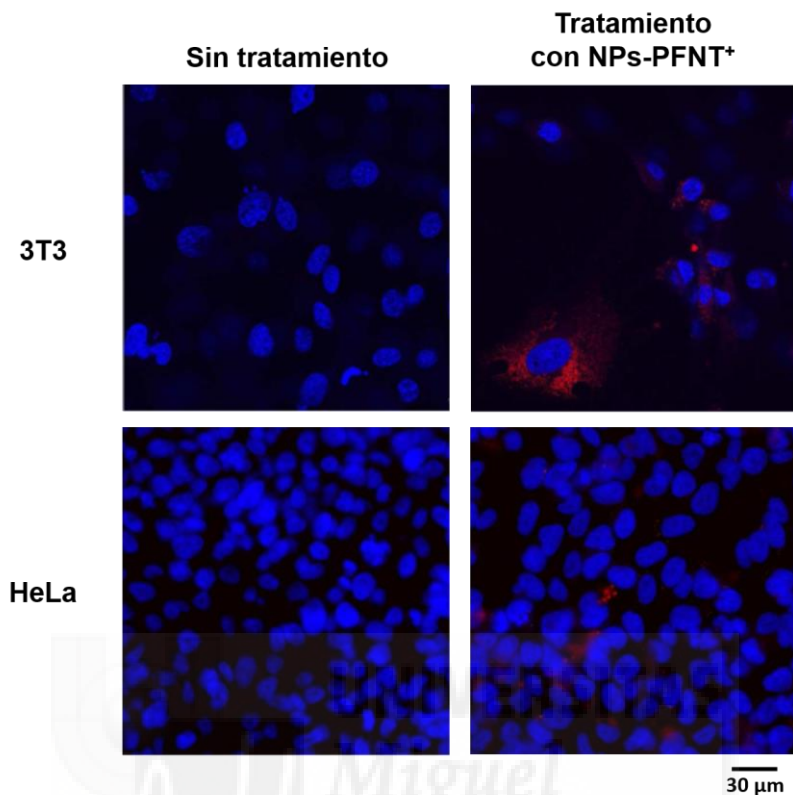
Existen otros pocos ejemplos en la bibliografía confirmando esta propiedad para los PCs basados en fluoreno<sup>145</sup>. Otros PCs similares pero basados en otra base estructural como son los xantenos tipo Rosa de Bengala, sales de piridinio y amonio y algunas quinolonas, también fluorescentes, han mostrado cualidades parecidas<sup>142,144,145</sup>. En muchos de los casos, estos PCs presentan además actividad antimicrobiana, aunque ésta parece activarse o aumentar con la presencia de luz a la longitud de onda adecuada<sup>142-145</sup>. En todo caso, cabe añadir que la afinidad de los PCs por el componente celular diana puede depender de la composición del tampón en el que se realiza la mezcla de ambos. En este sentido, en otro estudio con PCs basados en imidazol<sup>143</sup>, se describió, aunque no de manera muy extensa, que la concentración de NaCl era clave para

dicha unión. Estudios más detallados son todavía necesarios para conocer mejor tanto la dinámica como el sitio de la unión de los PCs.

#### **3.4.1.2. Determinación de la localización/internalización de NPs fluorescentes en células eucariotas mediante microscopía óptica de fluorescencia**

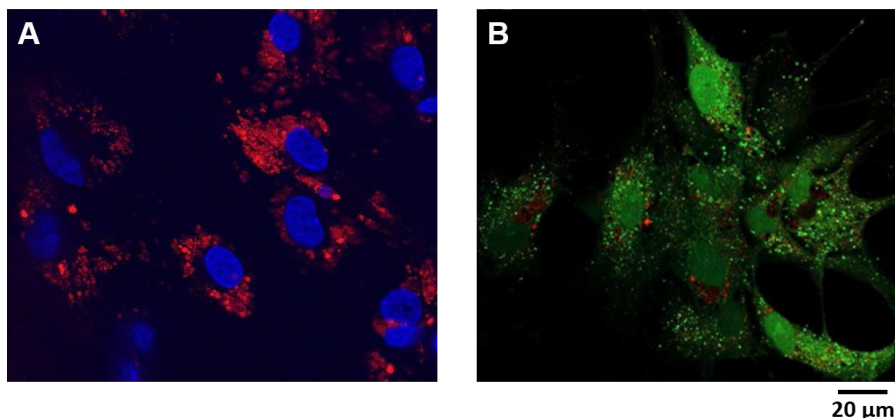
Dada la propiedad fluorescente con la que se puede dotar a las NPs al combinar el PMVEMA-ES con PCs fluorescentes en la síntesis de estas, la internalización y localización de las NPs en células puede ser fácilmente detectable y descrita. Las líneas celulares utilizadas fueron HeLa (al igual que en el apartado anterior) y 3T3 (fibroblastos de tejido embrionario de ratón). Las NPs utilizadas fueron de 10 mg/mL con 1,50  $\mu$ M de PFNT<sup>+</sup>. Se utilizó únicamente este polielectrolito ya que por los resultados de los ensayos anteriores parecían presentar menor afinidad por las membranas eucariotas que el PFP<sup>+</sup>. Otros ensayos se realizaron con cultivos primarios de tejido nervioso extraído de rata embrionaria. Todos estos ensayos se realizaron en el contexto de una colaboración con el grupo del Dr Eduardo Fernández Jover del Instituto de Bioingeniería.

El tratamiento de las líneas celulares citadas se realizó incubando cultivos celulares al 70-90% de confluencia con una concentración de NPs correspondiente a 10 mg/mL de PMVEMA-ES (1,50  $\mu$ M de PFNT<sup>+</sup>) durante 4 días. En ambos casos (más apreciable en las células 3T3) se observa una distribución punteada alrededor de los núcleos en algunas células (figura 23).



**Figura 23:** Imágenes de fluorescencia de células 3T3 y HeLa con y sin tratamiento de NPs-PFNT<sup>+</sup> durante 96 h. Las NPs están compuestas por 10 mg/mL de PMVEMA-ES con [PFNT<sup>+</sup>] = 1,5 μM. Los núcleos de las células fueron marcados con Hoechst (tinción azul).

Además de líneas celulares se decidió también tratar cultivos primarios. En un intento por aproximarnos más a lo que sucedería en las células de un organismo. Con este objetivo, se procedió a observar por microscopía óptica de fluorescencia células de cultivos primarios de corteza cerebral embrionaria y retina de rata que fueron tratados como se describe anteriormente para las líneas celulares (figura 24).



**Figura 24:** Imágenes de fluorescencia de células de cultivos primarios de corteza cerebral (A) y retina (B) de embriones de rata tratadas con NPs-PFNT<sup>+</sup>. En ambos casos las células fueron tratadas con 1 mg/mL de NPs y 0,15 µM de PFNT<sup>+</sup> durante 7 días. Los núcleos de las células en A fueron marcados con Hoechst (tinción azul). Los núcleos y citoplasmas en B están marcados con calceína (tinción verde).

En las imágenes de la figura 23 se puede observar una mayor internalización de las NPs con PFNT<sup>+</sup> en las células de estos cultivos primarios en comparación con la observada en las líneas celulares (figura 22). Por tanto, en los cultivos primarios las NPs parecen localizarse en el citoplasma, mayoritariamente en las cercanías del núcleo (probablemente en el retículo endoplásmico).

Ocasionalmente se detectaron NPs en el núcleo, pero este fenómeno no es común a todas las imágenes. Estos datos coinciden con los publicados por Ojer y col.<sup>146</sup> en los que se observa como diferentes tipos de nanopartículas se distribuyen por el interior del citoplasma, aunque cabe destacar que aquellas nanopartículas que estaban pegiladas tenían más predisposición por situarse cerca de las membranas plasmáticas. Por otra parte, estudios recientes de

nanopartículas realizadas con poli (DL- láctico-co- glicólico) han demostrado una salida rápida de las nanopartículas desde el compartimento endolisosomal al compartimento citoplasmático<sup>111,147</sup>.

### **3.4.2. Determinación de la internalización/localización de las NPs en cultivo primario mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

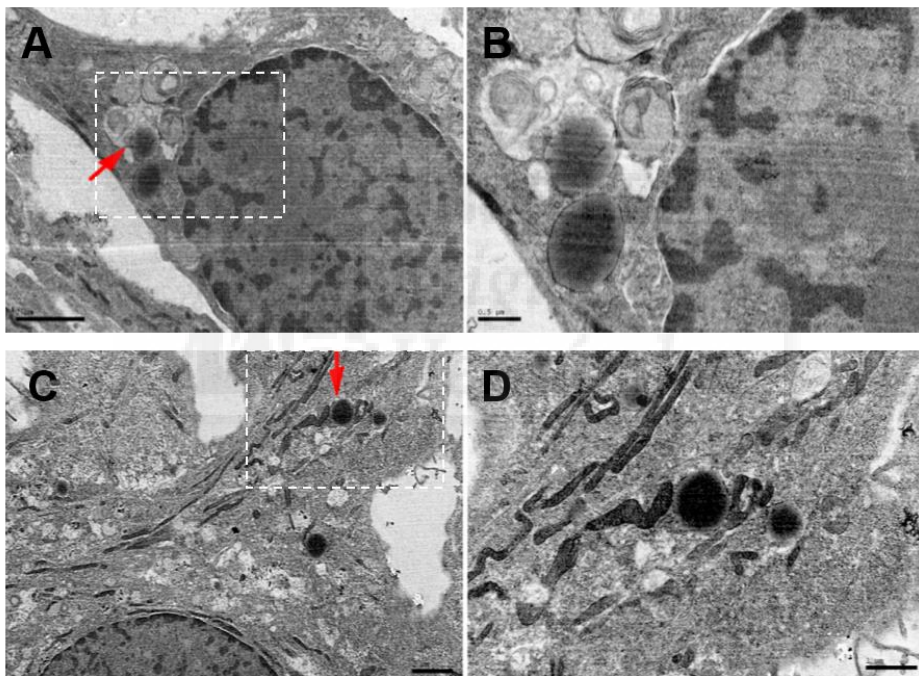
Para determinar con mayor precisión la localización de las NPs en muestras biológicas se realizó el siguiente estudio mediante TEM. Las células seleccionadas para estos ensayos fueron las de cultivo primario de corteza cerebral de rata embrionaria al haberse observado en estas células una mayor internalización de NPs en los estudios con microscopía óptica de fluorescencia. Por tanto, el tratamiento de estos cultivos para los ensayos de TEM fue igual al realizado en los de microscopía óptica de fluorescencia anteriormente descritos.

En las imágenes seleccionadas de la figura 24, se aprecia la presencia de varias NPs (algunas en concreto indicadas con una flecha roja) en el interior de células que por su morfología parecen ser astrocitos. La identificación de las NPs (formas circulares muy contrastadas) es difícil en algunos casos al poderse confundir con elementos celulares como por ejemplo mitocondrias cortadas transversalmente. Cabe destacar que el tamaño de las NPs observadas varía mucho lo cual puede deberse a varias circunstancias tales como el plano de corte realizado con ultramicrotomo en la preparación de las muestras (ver sección 2.2.4 de materiales y métodos). Por otro lado, algunas NPs parecen más grandes de lo estimado por otros métodos, lo cual puede ser debido a



que en el proceso de internalización éstas sean envueltas por membranas procedentes de lisosomas celulares que aumenten su tamaño aparente.

Como se muestra en esta figura en ocasiones la localización de las NPs era próxima a cuerpos residuales o maquinaria lisosomal (figura 25A y 25B). En otros casos, se detectaban las NPs en zonas con alta densidad de mitocondrias, rodeadas por ellas, como se puede apreciar en la imagen de la figura 25 y su ampliación (figura 25C y 25D).



**Figura 25: Detalle de la localización de NPs obtenida por TEM en un cultivo primario de corteza cerebral de rata embrionaria.** A y C) La barra de escala corresponde a 2  $\mu\text{m}$ . B y D) Ampliaciones de la región enmarcada en línea discontinua en A y C, respectivamente. B y D) La barra de escala corresponde a 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Ejemplos de NPs son indicados con una flecha roja.

La presencia de NPs cercanas a lisosomas (A y B) es probablemente debido al proceso de degradación de las NPs en el interior de las células. En cuanto a la localización de las NPs en las proximidades de las mitocondrias (C, D), este fenómeno se ha observado también en otras imágenes similares a las presentadas en este trabajo. Aunque se requieren más estudios para clarificar dicho suceso, si las NPs tienden a acumularse en las proximidades de las mitocondrias esta disposición podría ser útil para funcionalizar las NPs descritas en este trabajo hacia tratamientos orientados a solucionar disfunciones relacionadas con estos orgánulos.

### **3.5. Viabilidad celular**

#### **3.5.1. Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con PCs y NPs (con y sin PCs) de líneas celulares**

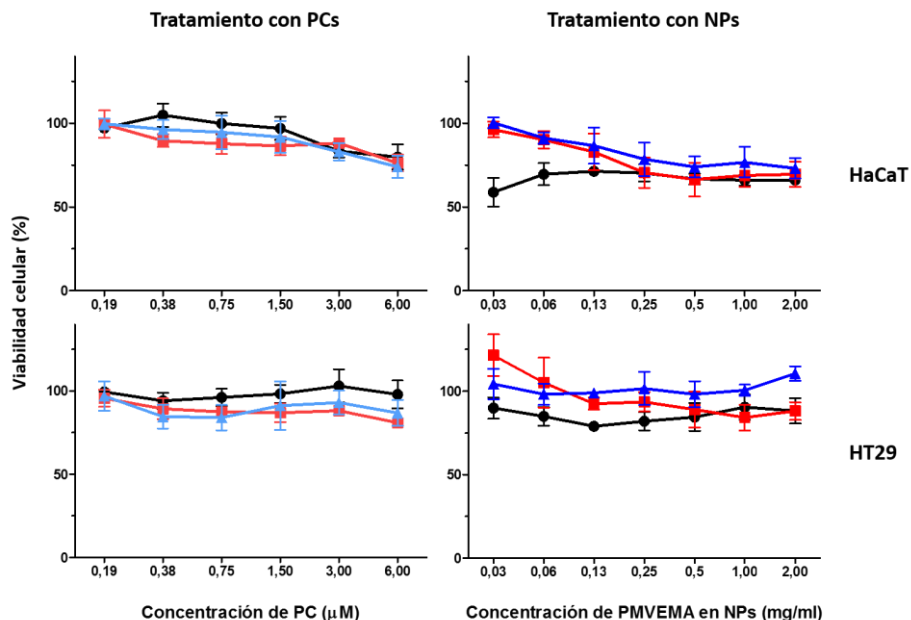
Tras la optimización de la síntesis de los diferentes tipos de NPs y su caracterización, se procedió al análisis de la funcionalidad de estos en ensayos biológicos *in vitro*. En este punto, se decidió comenzar por determinar los niveles de citotoxicidad en líneas celulares humanas tanto del sistema nanoparticulado en sí (NPs con y sin PCs), como de los PCs por separado y como referencia (figura 26). Las líneas celulares utilizadas fueron HaCaT (anteriormente usada en los experimentos de microscopía) y una línea celular de adenocarcinoma de colon (HT-29).

Como se puede observar en la figura 26, los distintos tratamientos conteniendo PCs mostraron perfiles de toxicidad similares a los correspondientes en ausencia de estos, es decir, concentraciones de DMSO equivalentes a las que corresponderían a la concentración de PC utilizada en cada caso y NPs creadas usando

tan solo PMVEMA. En términos generales, las células HaCaT parecen ser más sensibles a los tratamientos que las HT-29 ya a que, por ejemplo, a la máxima concentración utilizada para ambos tipos de tratamiento los porcentajes de viabilidad celular fueron de 74,0% (PFP<sup>+</sup>) y 66,1% (NPs sin PCs) para las primeras frente a 80,9% (PFNT<sup>+</sup>) y 88,1% (NPs con PFNT<sup>+</sup>) para las HT-29. En cualquier caso, salvo excepciones, se alcanzó más de un 85% de viabilidad celular con 1,5  $\mu$ M (en HaCaT) y 3  $\mu$ M (en HT-29) en los tratamientos con PCs y con 0,13 mg/mL (en HaCaT) y 2 mg/mL (en HT-29) de PMVEMA-ES en los tratamientos con NPs.

Las excepciones a los anteriores resultados se encuentran en los tratamientos con NPs sintetizadas sin PCs, caso mucho más acentuado en las células HaCaT (lo cual está en sincronía con la tendencia general encontrada en estos ensayos). En detalle, se observa que a las concentraciones más bajas (0,03-0,6 mg/mL) el tratamiento con NPs sin PCs los porcentajes de viabilidad celular fueron significativamente más bajos que con NPs con PFNT<sup>+</sup> y/o NPs con PFP<sup>+</sup> (ANOVA de dos vías,  $P < 0,05$  -  $P < 0,001$ ). El significado biológico de esta observación es difícil de interpretar con los datos actuales y el tratamiento de otras líneas celulares sería necesario.

Estadísticamente (ANOVA de dos vías), en todos los casos el tipo de tratamiento produce cambios significativamente diferentes ( $P < 0,05$  -  $P < 0,001$ ) y en todos salvo el tratamiento de HT-29 con PCs el factor concentración influye significativamente también ( $P < 0,01$  -  $P < 0,001$ ).



**Figura 26: Viabilidad celular en células HaCaT y HT-29 tras el tratamiento con PCs en disolución y NPs con y sin PCs.** Diferentes concentraciones de PC (de 0,03 a 6  $\mu\text{M}$ ) y NPs (de 0 a 2 mg/mL en PMVEMA) fueron incubados durante 24 h a 37 °C con las líneas celulares en placas de 96 pocillos por triplicado. Los resultados están representados como la media con desviación estándar de tres experimentos independientes. Leyenda: en negro, sin polielectrolito; en azul, con PFP<sup>+</sup> y en rojo, con PFNT<sup>+</sup>.

### 3.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los PCs y las diferentes formulaciones nanoparticuladas

Desde un principio, el objetivo del presente estudio era no sólo la creación de NPs poliméricas con capacidad de carga usando PMVEMA como polímero transportador sino además la evaluación de estas nanoestructuras como sistema de transporte y liberación de un compuesto terapéutico, concretamente, antimicrobiano. En este

sentido, dada la gran afinidad observada anteriormente de los PCs por componentes celulares (probablemente superficiales) y, sobre todo, la preferencia de PFNT<sup>+</sup> por aquellos componentes de origen bacteriano, los ensayos diseñados para evaluar la capacidad antimicrobiana de agentes antimicrobianos nanoencapsulados van a incluir dichos PCs. Así, la posibilidad de interacciones sinérgicas o sumativas de estos PCs a la del antimicrobiano se podrá evaluar aunque inicialmente la finalidad del uso de los PCs fuera como señalizador de la distribución de las NPs. Por esta razón, también se realizaron una serie de estudios preliminares para evaluar la actividad antimicrobiana de los PCs individualmente.

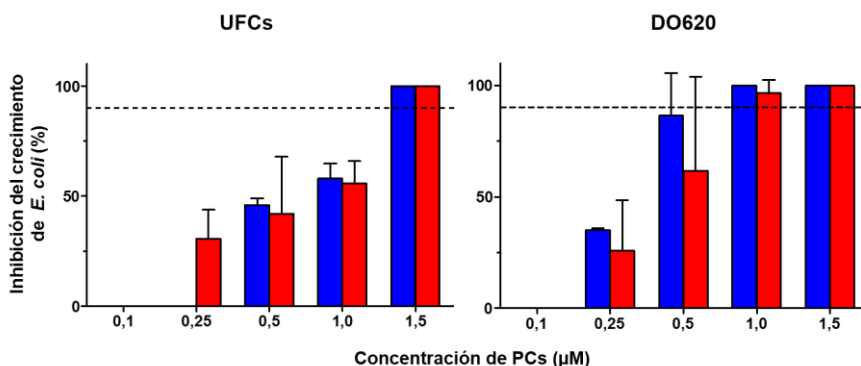
### **3.6.1. Estudio de la actividad antimicrobiana de los PCs**

#### **3.6.1.1. Selección de métodos para determinar la actividad antimicrobiana de los PCs**

Para seleccionar un método de valoración de la actividad antimicrobiana y determinar la capacidad antimicrobiana de los PCs en disolución, se usaron tres métodos diferentes para determinar la actividad antimicrobiana usando *E. coli* como microorganismo experimental modelo en este caso. Los métodos escogidos fueron determinar la CI<sub>90</sub> de los PCs por conteo de UFCs y medición de la DO<sub>620</sub> y determinar la CMI mediante el método de microdilución en caldo de cultivo.

La metodología seguida en este apartado viene descrita en la sección 2.2.7 de material y métodos de este capítulo. Los ensayos para cada método fueron realizados tres veces de forma independiente y por triplicado (excepto en la microdilución en caldo de

cultivo que fue realizado por duplicado). En la figura 27 se muestra los resultados obtenidos por los métodos destinados a determinar la  $CI_{90}$ .



**Figura 27: Determinación de la inhibición del crecimiento de *E. coli* mediante contaje de UFCs y determinación de DO620.** El rango de concentraciones seleccionado para las gráficas comienza a partir de la concentración mínima probada que muestra inhibición total del crecimiento bacteriano. Los resultados están expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento. La línea de rayas horizontal indica el 90% de inhibición. Las barras azules indican tratamiento con PFP<sup>+</sup> y las rojas con PFNT<sup>+</sup>.

Como se puede observar en la figura los valores son muy parecidos entre métodos. Además, ambos PCs muestran perfiles muy parecidos en los que el porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* producido es dependiente de la concentración de estos (ANOVA de dos vías;  $P < 0,0001$  en ambos métodos;  $F$  (F de Snedecor, que hace referencia a una distribución de probabilidad continua) = 90,72 para el método de contaje de UFCs y  $F = 44,91$  para el de medición de DO620). Por el método de contaje de UFCs la  $IC_{90}$  para ambos PCs

parece estar comprendida entre 1 y 1,5  $\mu\text{M}$  mientras que por el de DO620 está entre 0,5 y 1  $\mu\text{M}$ .

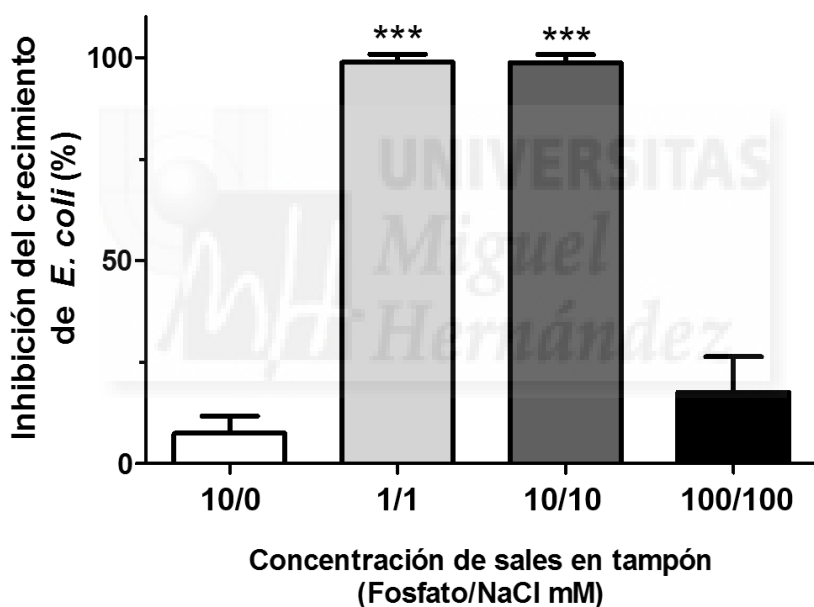
Cuando se determina la CMI por el método de microdilución el resultado fue mucho mayor en comparación con los dos métodos anteriores,  $5,7 \pm 2,7 \mu\text{M}$  para ambos PCs. Esta diferencia puede deberse a que en los otros dos casos las bacterias fueron incubadas con los PCs en tampón fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl durante 6h a 37 °C, previamente al sembrado en placas Petri (método de conteo de UFCs) o adición de caldo de cultivo y distribución en placas de 96 pocillos (método de determinación de DO620). Sin embargo, en el método de microdilución, la interacción entre PC y bacteria es, desde el inicio en un medio rico en muchos tipos de moléculas diferentes que pueden modificar las propiedades de los PCs y/o bloquear su unión por los componentes celulares.

### **3.6.1.2. Descripción del efecto de la composición de los tampones en la actividad antimicrobiana de los PCs**

Como se comentó anteriormente, cuando se discute la afinidad de los PCs por los componentes celulares, dicha afinidad y, por tanto, la potencial actividad antimicrobiana asociada, puede variar dependiendo de la composición del medio en el que se co-incuban como se describe en el trabajo de Lee y col. (2016)<sup>143</sup>. Para comprobar si en los PCs de esta tesis la composición del tampón, y en concreto la cantidad de cloruro sódico (NaCl) como apunta el autor referenciado, afecta a la afinidad de éstos por los componentes celulares y como consecuencia a la actividad antimicrobiana de los PCs, se procedió a determinar por DO620 la inhibición del crecimiento de bacterias *E. coli* tratadas con PFNT<sup>+</sup>. Se escogió este polielectrolito por ser el que mejor se unía a las membranas bacterianas y mostraba

más especificidad en tampones con distintas concentraciones de NaCl (figura 28).

Para la realización de este ensayo se escogió una concentración de PFNT<sup>+</sup> de 0.75  $\mu$ M, la cual se estima que es aproximadamente la CI<sub>90</sub> obtenida por este método en los ensayos anteriores (figura 26). En este caso (figura 27), el PFNT<sup>+</sup> causó una inhibición de aproximadamente el 100% ( $98,7 \pm 2,1\%$ ) cuando se preincubó (6 h) con las bacterias en el mismo tampón (fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl) que en aquellos ensayos.



**Figura 28: Efecto de la concentración de sales en la inhibición producida por PFNT<sup>+</sup> en el crecimiento de *E. coli*.** El rango de concentraciones de tampón incluye un tampón fosfato 10 mM sin NaCl y el usado para los experimentos anteriores (tampón control fosfato 10 mM con 10 mM de NaCl) dentro de una serie creciente en concentración de sales (1, 10 y 100 mM) con la misma concentración



de fosfato y NaCl. Los resultados están expresados en porcentaje con desviación estándar de inhibición del crecimiento. \*\*\*,  $P < 0,001$  (ANOVA de una vía).

Las concentraciones de las sales en los distintos tampones utilizados para comprobar el efecto de estas en la actividad del PC fueron 1, 10 y 100 mM (con la misma concentración en fosfatos y NaCl en cada tampón) y un tampón fosfato 10 mM sin NaCl. Como se observa en la figura 27, a concentraciones de 1 y 10 mM en ambas sales la inhibición en el crecimiento de *E. coli* producida por PFNT<sup>+</sup> es cercana al 100%. Estos valores son significativamente mayores ( $P < 0,001$  en ambos casos mediante ANOVA de una vía,  $F = 291,8$ ) que con el tampón control 10 mM fosfato sin NaCl, el aumento en la actividad antimicrobiana de PFNT<sup>+</sup> es probablemente debido a la presencia de NaCl. En este sentido, conviene señalar que a la concentración más alta (100 mM) la inhibición vuelve a estar aproximadamente a los niveles del control ( $17,6 \pm 8,7\%$ ).

Si bien la metodología utilizada no sirve para evaluar la afinidad de los PCs por los componentes celulares, la actividad antimicrobiana (que es la variable analizada) puede representar una medida indirecta de dicha afinidad si existe una, muy probable, relación directa entre unión y actividad antimicrobiana. A falta de comprobar la relación propuesta, se debe tener también en consideración que el aumento en la actividad antimicrobiana al aumentar la cantidad de NaCl puede ser debido a que se contribuye al desequilibrio osmótico entre el interior y exterior de las células lo cual afectaría negativamente a su integridad si sus membranas están siendo además perturbadas por la acción del PC. En este sentido, trabajos más exhaustivos enfocados a estudiar cómo afecta la

presencia de determinadas sales a la estructura química y estabilidad de estos PCs así como a sus propiedades químicas son necesarios.

### **3.6.1.3. Determinación de la CMI de los PCs mediante el método de microdilución en caldo para las diferentes especies de bacterias**

Volviendo al objetivo inicial, este era analizar la actividad antimicrobiana de las distintas formulaciones nanoparticuladas frente a un panel de especies bacterianas potencialmente infecciosas que incluye bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, así como multirresistentes a antibióticos. Para la realización de estos ensayos se decide utilizar el método de microdilución en caldo de cultivo. Las razones para la elección de este método frente a los otros son que el método de conteo de UFCs es demasiado tedioso para la vasta cantidad de variables a analizar y que el método de medición de la DO620 produce gran variabilidad en los resultados y es necesaria instrumentación no presente en las instalaciones del Departamento de Microbiología del Hospital General de Alicante. Además, el método de microdilución en caldo de cultivo es el utilizado por el personal especializado en las estancias citadas y se incluye entre los recomendados por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI)<sup>148</sup>.

Previamente a estos ensayos, y para concluir con el estudio de la actividad antimicrobiana de los PCs, se procedió a determinar la CMI de los PCs para el panel de bacterias patógenas utilizando este método (tabla 9). En general, estos resultados muestran que la CMI de cualquiera de los dos PCs para el conjunto de especies bacterianas utilizadas está dentro del margen 3,75-7,5 µM.

**Tabla 9:** CMI de los PCs para el panel de bacterias obtenida por el método de microdilución

Especie	Resistencia <sup>b</sup>	CMI <sup>a</sup> (µM)	
		PPF <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>
<i>E. coli</i>	NO	5,6±2,7	5,6±2,7
<i>E. coli</i> BLEE	SÍ	3,75	3,75
<i>K. pneumoniae</i>	NO	5,6±2,7	5,6±2,7
<i>K. pneumoniae</i>	SÍ	3,75	3,75
<i>S. aureus</i>	NO	5,6±2,7	4,7±1,3
<i>S. aureus</i> R*	SÍ	3,75	7,5

\* R=resistente a meticilina.

<sup>a</sup> Media ± sd de dos experimentos realizados por duplicado.

<sup>b</sup> Resistencia a antibióticos (SÍ/NO).

### 3.6.2. Determinación de la CMI de las formulaciones con antibióticos mediante el método de microdilución en caldo para las diferentes especies de bacterias

Finalmente, se realizaron los ensayos para determinar, mediante el método de dilución en caldo, la CMI de cada una de las formulaciones experimentales para el panel de bacterias patógenas presentado anteriormente. El objetivo es valorar la diferencia en actividad de los antibióticos al encapsularlos o combinarlos con PCs tanto en disolución como en el interior de la NPs. Las formulaciones incluyen cada uno de los antibióticos seleccionados en disolución con PPF<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> y en nanocápsulas sintetizadas con PMVEMA-ES, PMVEMA-ES + PPF<sup>+</sup> y PMVEMA-ES + PFNT<sup>+</sup>. En todos los ensayos se mantuvo constante la concentración de los polímeros (2,5 mg/mL de PMVEMA-ES y/o 3,75 µM de PCs) y sólo varió la del antibiótico en

cuestión. El gradiente de concentraciones de cada antibiótico fue diferente al depender de la eficiencia de encapsulación de cada uno de ellos.

Por tanto, en este gradiente, la concentración máxima para cada antibiótico es igual a la correspondiente para 2,5 mg/mL de PMVEMA-ES según cada cociente (antibiótico/PMVEMA-ES) de encapsulación obtenido. En consecuencia, los gradientes de concentraciones de los antibióticos en disolución solos o con PCs se adaptaron a los de NPs. Los resultados obtenidos y clasificados por antibióticos, se expresan en  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico y se corresponden a la media de dos experimentos por duplicado. Los resultados representados en las tablas que no muestran errores son debido a que no hubo ninguna variabilidad entre ambos experimentos.

### **3.6.2.1. CMI de las formulaciones con amikacina por el método de microdilución**

Como se discute en el apartado 2.3.2.1, la encapsulación de la amikacina fue la menos eficiente de los antibióticos seleccionados (EE%: 14-32%). Por esta razón, en el gradiente de concentraciones utilizado para la amikacina la concentración máxima fue 11,5  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla 10, se muestran las CMI obtenidas para cada una de las formulaciones experimentales con amikacina. A continuación, se describen y discuten los resultados más relevantes en comparación con la CMI obtenida para el control de antibiótico en disolución.

Respecto a la actividad de este antibiótico en combinación con los PCs en disolución, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las cepas de *E. coli* ni en la cepa resistente de *S. aureus* para ninguno de los PCs. En el resto de microorganismos la

combinación de antibiótico con PFP<sup>+</sup> redujo la CMI del antibiótico a la mitad aproximadamente mientras que no se observó variación con PFNT<sup>+</sup>.

Respecto a la actividad de este antibiótico cuando es encapsulado con o sin incluir PCs, la encapsulación redujo en gran medida la actividad del antibiótico para todos los microorganismos excepto para la cepa no resistente de *E. coli* y para las NPs con antibiótico de *S. aureus* resistente. En el caso de *E. coli*, las CMIs fueron similares a la del control en el caso de NPs sin PCs y con PFNT<sup>+</sup>, y hasta unas 10 veces inferiores en NPs con PFP<sup>+</sup>. Para *S. aureus* (R), la diferencia la marcó la encapsulación aumentando la actividad antimicrobiana prácticamente el doble.

**Tabla 10:** CMI de cada formulación con amikacina determinada por el método de la dilución de caldo de cultivo.\*

Especie de bacteria	ATB <sup>a</sup> c	ATB con PC <sup>a</sup>		ATB en NP <sup>b</sup>		
		PFP <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>	NP	PFP <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>
<i>E. coli</i> (S)	0,6	0,6	0,6	0,9	<b>0,05</b>	0,9
<i>E. coli</i> (R)	5,8	11,5	11,5	<b>4,5</b>	>11,5	<b>4,5</b>
<i>K. pneumoniae</i> (S)	0,7	5,8	11,5	<b>0,6</b>	11,50	<b>0,3</b>
<i>K. pneumoniae</i> (R)	0,7	5,8	11,5	0,6	11,5	<b>0,3</b>
<i>S. aureus</i> (S)	4,3±1	>11,5	>11,5	<b>3,4±0,8</b>	>11,5	<b>&gt;1,7</b>
<i>S. aureus</i> (R)	4,3±1	>11,5	>11,5	<b>&gt;2,25</b>	>11,5	<b>2,25</b>

<sup>a</sup> En disolución.

<sup>b</sup> Encapsulado.

<sup>c</sup>Concentración máxima en gradiente probada para este antibiótico fue **11,5** µg/mL.

\*En negrita aquellas CMI dos o más veces menores a la del control de antibiótico y en verde las que presentan valores menores.

### 3.6.2.2. CMI de las formulaciones con neomicina por el método de microdilución

La encapsulación de neomicina, otro aminoglucósido, también presentó ciertas limitaciones en su encapsulación, aunque finalmente pudieron obtenerse eficiencias (EE%: 40-51) que permitieron utilizar concentraciones máximas en los gradientes de 24,5 µg/mL. En la tabla 11, se muestran las CMI obtenidas para cada una de las formulaciones experimentales con neomicina. A continuación, se describen y discuten los resultados más relevantes en comparación con la CMI obtenida para el control de antibiótico en disolución.

**Tabla 11.** CMI de cada formulación con neomicina determinada por el método de la dilución de caldo de cultivo\*.

Especie de bacteria	ATB <sup>a,c</sup>	ATB con PC <sup>a</sup>		ATB en NP <sup>b</sup>		
		PFP <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>	NP	PFP <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>
<i>E. coli</i> (S)	0,6	0,6	0,6	<b>0,08±0,04</b>	2,5	<b>&gt;0,042</b>
<i>E. coli</i> (R)	4,6±1.1	>24,5	>24,5	<b>3,5</b>	>24,5	4,1
<i>K. pneumoniae</i> (S)	1,5	>24,5	>24,5	1,2	>7,7	<b>1,03</b>
<i>K. pneumoniae</i> (R)	1,5	>24,5	>24,5	<b>1,2</b>	>24,5	<b>1,03</b>
<i>S. aureus</i> (S)	1,5	>24,5	>24,5	<b>1,2</b>	>12,5	<b>1,03±0,14</b>
<i>S. aureus</i> (R)	>24,5	>24,5	>24,5	>24,5	>24,5	>24,5

<sup>a</sup> En disolución.

<sup>b</sup> Encapsulado.

<sup>c</sup> Concentración máxima en gradiente probada para este antibiótico: **24,5** µg/mL.

\* En negrita aquellas CMI dos o más veces menores a la del control de antibiótico y en verde ligeramente menores.

Respecto a la actividad de este antibiótico en combinación con los PCs en disolución, sólo se observaron diferencias significativas con respecto al control en la cepa sensible de *S. aureus* para la que la

combinación con cualquiera de los PCs la CMI del antibiótico disminuye hasta unas 4 veces.

Respecto a la actividad de este antibiótico cuando es encapsulado con o sin incluir PCs, al igual que ocurre con la amikacina encapsulada, la encapsulación redujo en gran medida la actividad del antibiótico para todos los microorganismos excepto para la cepa no resistente de *E. coli*. En este caso, la CMI de la neomicina encapsulada sin incluir ningún PC fue unas siete veces inferior a la del control.

Para este mismo organismo la encapsulación del antibiótico en presencia de PCs redujo su actividad significativamente en el caso del PFNT<sup>+</sup>, sobre todo con PFP<sup>+</sup>.

### **3.6.2.3. CMI de las formulaciones con ciprofloxacino por el método de microdilución**

La concentración máxima utilizada en los gradientes con este antibiótico es 32,5 µg/mL. En la tabla 12 se muestran las CMIs obtenidas para cada una de las formulaciones experimentales con ciprofloxacino. Aunque en ninguno de los casos se observa un aumento de actividad antimicrobiana del ciprofloxacino con las formulaciones experimentales, como sí ocurre con los aminoglucósidos, los valores obtenidos tampoco muestran descensos significativos salvo para la cepa resistente de *S. aureus* en cualquiera de las formulaciones del antibiótico encapsulado. En otras palabras, estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana del ciprofloxacino no se ve afectada ni por su encapsulación ni por su combinación con los PCs. Por consiguiente, si se comprobase que el fenómeno de encapsulación ofrece propiedades beneficiosas tales

como protección a la degradación por agentes físico-químicos y/o biológicos que mantuvieran estable la integridad estructural del ciprofloxacino, este es un candidato prometedor a ser administrado contenido en nanocápsulas de PMVEMA-ES.

**Tabla 12.** CMI de cada formulación con ciprofloxacino determinada por el método de la dilución de caldo de cultivo\*.

Especie de bacteria	ATB <sup>a,c</sup>	ATB con PC <sup>a</sup>		ATB en NP <sup>b</sup>		
		PF <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>	NP	+PF <sup>+</sup>	+PFNT <sup>+</sup>
<i>E. coli</i> (S)	0,0008	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002
<i>E. coli</i> (R)	>32,5	>32,5	>32,5	>32,5	>32,5	>32,5
<i>K. pneumoniae</i> (S)	0,09±0,02	0,13	0,13	<b>0,063</b>	0,32	<b>0,05</b>
<i>K. pneumoniae</i> (R)	8,1	32,5	32,5	8,13	<b>2,7</b>	9,9±2,3
<i>S. aureus</i> (S)	0,5	0,76	0,76	0,51	1,3	0,6
<i>S. aureus</i> (R)	8,1	>32,5	>32,5	>32,5	>32,5	>32,5

<sup>a</sup> En disolución.

<sup>b</sup> Eencapsulado.

<sup>c</sup> Concentración máxima en gradiente probada para este antibiótico: **32,5** µg/mL.

\* En negrita aquellas CMI dos o más veces menores a la del control de antibiótico y en verde ligeramente menores.

#### 3.6.2.4. CMI de las formulaciones con cefotaxima por el método de microdilución

La concentración máxima utilizada en los gradientes con este antibiótico es 31,5 µg/mL. En la tabla 13 se muestran las CMIs obtenidas para cada una de las formulaciones experimentales con cefotaxima. De manera similar a como ocurre con el ciprofloxacino, aunque se observan pocos casos de aumento de actividad antimicrobiana de la cefotaxima con las formulaciones experimentales (por ejemplo, CMIs entre dos y cuarenta veces inferiores respecto al control cuando la cefotaxima está encapsulada, con y sin PCs), los



valores obtenidos tampoco muestran descensos destacados. La cefotaxima, al igual que como el ciprofloxacino, es por tanto otro candidato prometedor a ser administrado contenido en nanocápsulas de PMVEMA.

**Tabla 13:** CMI de cada formulación con cefotaxima determinada por el método de la dilución de caldo de cultivo\*.

Especie de bacteria	ATB <sup>a,c</sup>	ATB con PC <sup>a</sup>		ATB en NP <sup>b</sup>		
		PF <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>	NP	+PF <sup>+</sup>	+PFNT <sup>+</sup>
<i>E. coli</i> (S)	0,08	0,08	0,08	<b>0,04±0,02</b>	<b>0,04±0,01</b>	0,12±0,06
<i>E. coli</i> (R)	>31,5	>31,5	>31,5	31,5	>31,5	>31,5
<i>K. pneumoniae</i> (S)	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02±0,01	0,02±0,01
<i>K. pneumoniae</i> (R)	>31,5	>31,5	>31,5	>31,5	>31,5	>31,5
<i>S. aureus</i> (S)	1,2	<b>0,25</b>	<b>0,98</b>	2,3	<b>0,05</b>	1,9
<i>S. aureus</i> (R)	>31,5	>31,5	>31,5	>31,5	>31,5	>31,5

<sup>a</sup> En disolución.

<sup>b</sup> Encapsulado.

<sup>c</sup> Concentración máxima en gradiente probada para este antibiótico: **31,5** µg/mL.

\*En negrita aquellas CMI dos o más veces menores a la del control de antibiótico.

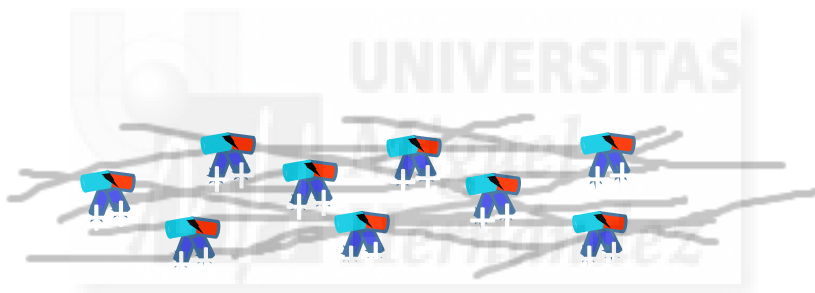
A modo resumen, en la tabla siguiente, se recogen todos los datos más importantes que han supuesto una mejora en los valores de CMI expresados en las tablas 10-13 anteriores.

**Tabla 14.** Resumen de CMIs de cada formulación de NPs de PMEHEMA-ES empleando cuatro antibióticos distintos y dos PCs<sup>a</sup>

Especie bacteriana	Nps				Referencia ATB <sup>b</sup>	
	Antibiótico	-	PFP <sup>+</sup>	PFNT <sup>+</sup>		
<i>S. aureus</i>	S	Amikacina	3,4		1,7	4,3
		Neomicina				
	R	Ciprofloxacino				1,2
		Cefotaxima		0,05		
<i>K. pneumoniae</i>	S	Amikacina	0,56		0,28	0,72
		Neomicina	1,15		1,03	1,53
	R	Ciprofloxacino	0,063		0,052	0,095
		Cefotaxima		0,015		0,023
<i>E. coli</i>	S	Amikacina		0,05		0,6
		Neomicina	0,08		0,04	0,6
	R	Ciprofloxacino				0,08
		Cefotaxima	0,04	0,04		
<i>E. coli</i>	S	Amikacina	4,5		4,5	5,75
		Neomicina	3,5		4,13	4,6
	R	Ciprofloxacino				
		Cefotaxima				

<sup>a</sup> CMI determinada por el método de la dilución de caldo de cultivo.

<sup>b</sup> Referencia ATB corresponde con la concentración máxima en gradiente probada para el antibiótico.



# **CAPÍTULO IV**

## **NANOFIBRAS**





## **Introducción**



## 1. Introducción

### 1.1. Nanofibras en biomedicina

La nanotecnología mediante diferentes procesos de nanoencapsulación, puede aumentar significativamente la protección de productos farmacéuticos frente a la degradación ambiental y al suministro dirigido a un sitio específico y / o liberación controlada. Desde un punto de vista clínico, estas contribuciones son de gran interés porque pueden mejorar la eficacia de las sustancias terapéuticas y de diagnóstico, por ejemplo, aumentando sus semividas y especificidad circulantes y reduciendo así su dosificación y efectos secundarios<sup>149</sup>.

En cuanto a los materiales que se pueden utilizar para desenvolver este fin, los polímeros tienen la ventaja sobre otros materiales de comprender un gran número de moléculas biocompatibles y biodegradables. Algunos de estos polímeros, son adaptados mediante protocolos relativamente viables y cortos, para la construcción de diferentes tipos de nanoestructuras susceptibles de ser cargadas y así poder satisfacer las necesidades clínicas requeridas. Estos sistemas, se pueden conformar y ajustar el tamaño para adaptarse a los requisitos de la ruta o al dispositivo de suministro seleccionado. Con respecto a esta última característica, las formas más populares, aunque versátiles, son principalmente nanoparticuladas, aunque las nanofibras poliméricas están adquiriendo cada vez más importancia debido a sus características únicas, adecuadas para aplicaciones médicas tales como prótesis de tejidos y apósitos<sup>150-153</sup>.

Las nanofibras son materiales unidimensionales y se caracterizan por presentar un diámetro ( $\Phi$ ) generalmente entre 50 y 500 nm y una longitud (L) con una relación  $L/\Phi > 10$ . Su tamaño les

confiere una elevada relación superficie/volumen, poseen una alta porosidad y un pequeño tamaño de poro. Además, los sistemas nanoestructurados manifiestan unas propiedades de superficie diferentes a los materiales convencionales.

Para su uso en biomedicina un requisito inicial es que las nanofibras estén compuestas de materiales biocompatibles que hayan demostrado no presentar toxicidad sobre los tejidos y organismos vivos. Con este fin se emplean mayoritariamente polímeros sintéticos (poliésteres, polialcoholes, poliéteres y polianhídridos) o biopolímeros (quitina, quitosano, colágeno, fibroína de seda o celulosa).

Con respecto a las aplicaciones terapéuticas actualmente en desarrollo cabe destacar la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, donde se utilizan las nanofibras para fabricar estructuras tridimensionales porosas y ordenadas que simulan la matriz extracelular y estimulan el crecimiento celular. Se han utilizado con éxito tanto para la fabricación de tejidos *in vitro* como para la regeneración *in vivo* de heridas y lesiones músculo-esqueléticas<sup>154,155</sup>.

Por otro lado, las nanofibras son de interés en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas para la vía tópica, generalmente en forma de apósitos, parches transdérmicos o implantes biodegradables<sup>156</sup>. Se ha estudiado especialmente la vehiculización y liberación de: factores de crecimiento, genes y células madre para medicina regenerativa<sup>155,157</sup>, antibióticos para profilaxis de infecciones asociadas a prótesis<sup>158,159</sup> y antitumorales cuando se prefiere un efecto local para aumentar la eficacia y minimizar toxicidad sistémica<sup>160</sup>. En esta memoria se ha vehiculizado el ácido 5-aminolevulínico (ALA), que es un precursor natural del fotosensibilizador Protoporfirina IX empleada para terapia fotodinámica.



## 1.2. Electrohilatura

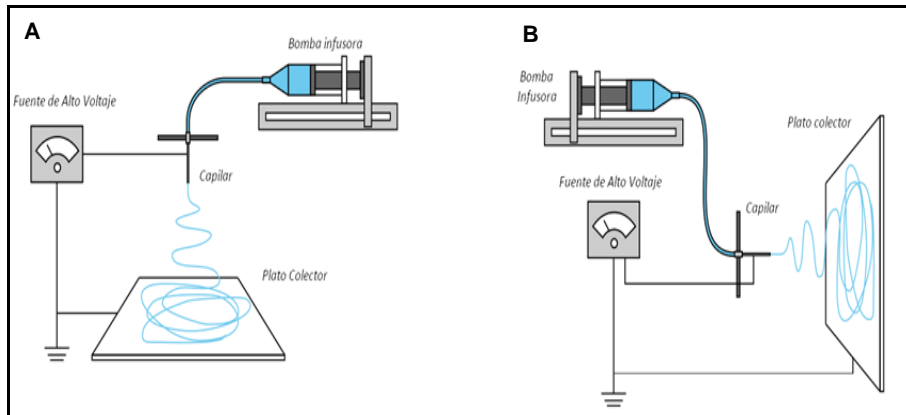
Para elaborar nanofibras, se pueden utilizar diversas técnicas entre las que se encuentran, deposición de vapor<sup>161</sup>, separación de fase<sup>162</sup>, hilado centrífugo<sup>163</sup>, de autoensamblado<sup>164</sup>, pero la electrohilatura o del inglés electrospinning<sup>165</sup> es la más adoptada debido a un conjunto de valiosas características adecuadas para aplicaciones médicas<sup>166,167</sup>.

La técnica de electrospinning o electrohilatura fue patentada por Formhals en 1934 y en los últimos años gracias al impulso de la nanotecnología se ha vuelto a rescatar esta técnica por Doshi y D.H.Reneker en 1995<sup>168</sup>. La electrohilatura, permite obtener fibras de diversos diámetros, longitudes y porosidades (densidad y tamaño de poro) y es una técnica, que destaca por su versatilidad, sencillez, facilidad de implantación, coste-efectividad<sup>169</sup> y posibilidad de escalado industrial.

## 1.3. Electrohilatura: principios de la técnica

Este método consiste en aplicar un campo electrostático elevado entre dos polos, conformados por una aguja con un sistema de inyección y un colector metálico donde se depositan las fibras, formando una película de baja relación peso-volumen<sup>170-173</sup>.

El equipo mediante el que se fabrican las nanofibras, puede disponerse en horizontal y vertical. Una disposición vertical (figura 1A), asegura que todo el material quede en el colector frente a una disposición horizontal (figura 1B). Sin embargo, si hay goteo y/o falta de evaporación del disolvente debido a la baja viscosidad de la disolución, se producirán más imperfecciones. En el caso que ocupa esta memoria, se ha seleccionado la disposición en horizontal, de este modo, se asegura la producción de nanofibras, aunque puede haber pérdidas en el caso que no todo el disolvente se evapore.



**Figura 1: Distribución del equipo de electrospinning.**

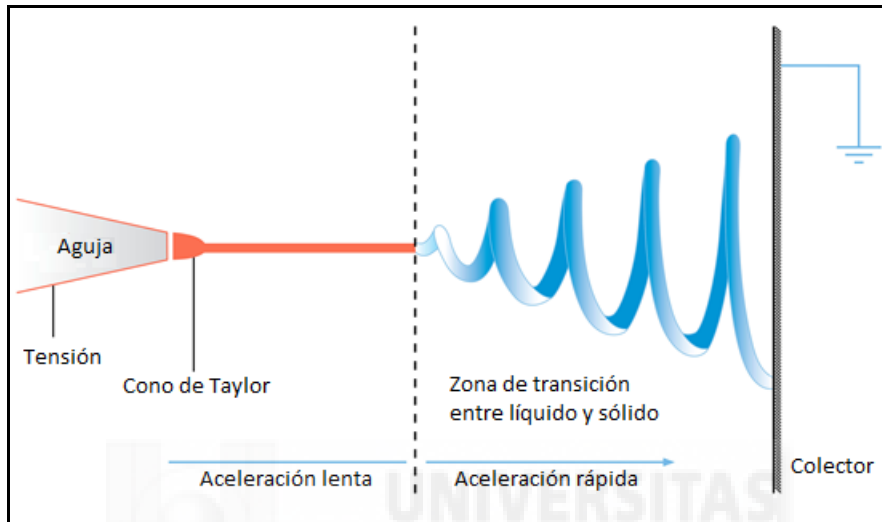
A) Vertical. B) Horizontal

Como se observa en la figura 1, la disposición horizontal, posee en la parte izquierda situada una jeringa cargada con la disolución polimérica previamente preparada con una viscosidad adecuada. Este fluido viscoelástico, será impulsado por una bomba de infusión con el flujo elegido. En esta bomba, se sitúa la jeringa de manera que la bomba empuja al émbolo, generando una presión constante que se transmite a la disolución del polímero en la aguja. El campo eléctrico genera una polarización en la gota que se queda cargada. La solución es atraída en forma de chorro hacia la superficie conductora del colector, situada a cierta distancia, y conectada a potencial cero (toma de tierra). El disolvente se evapora gradualmente a medida que hace el recorrido entre la aguja y el colector, de esta manera se obtienen fibras no tejidas distribuidas al azar que se van depositando en el colector. Se denomina *jet* o chorro, al flujo de fluido impulsado desde la jeringa hasta la placa colector.

En esta técnica, durante el recorrido entre los dos electrodos (punta de la aguja y colector) se produce un fenómeno denominado cono de Taylor<sup>170,172-175</sup> (figura 2).

Este fenómeno, consiste en que las cargas son inducidas en el fluido durante el recorrido entre los electrodos, la tensión superficial se

rompe a través del campo eléctrico y se descompone en una fuerza tangencial y una normal. Su nombre, se debe a la geometría cónica que adopta a la salida de la aguja.



**Figura 2:** Esquema del proceso de *electrospinning*

Este proceso, genera una aceleración significativa en el chorro o *jet*, de manera que su diámetro disminuye en magnitud. El *jet* acaba solidificándose y se convierte en una fibra de escala nanométrica. La corriente aplicada en la operación es de alto voltaje, pero de intensidad muy reducida (orden de microamperios)<sup>171</sup>.

Los resultados, no siempre son predecibles, depende del control de las variables del proceso como la naturaleza del disolvente empleado, la concentración del polímero en la disolución u otras variables de aspecto operativo del equipo de electrospinning. En algunos casos el polímero no se procesa en forma de fibras, sino que se queda en fibras mezcladas con gotas o simplemente en forma de gotas y se conoce con el término de electrospray, fenómeno empleado en la ionización de las moléculas en espectroscopía de masas.

#### 1.4. Electrohilatura: control operacional

Las propiedades de las fibras, se ven afectadas por diversos parámetros que afectan simultáneamente a las propiedades de las nanofibras obtenidas. Los parámetros operacionales se pueden clasificar en tres grupos<sup>175,176</sup>.

I. Parámetros de la disolución: tipo de polímero empleado (peso molecular, estructura...), concentración de polímero, viscosidad, conductividad, densidad de carga en la superficie, tensión superficial, constante dieléctrica del disolvente.

II. Parámetros del equipo: velocidad de flujo de la bomba infusora, potencial eléctrico generado por la fuente de alto voltaje, distancia entre los electrodos (punta de aguja y colector), geometría y tipo de colector.

III. Parámetros ambientales: humedad relativa, temperatura de la disolución, atmósfera controlada y velocidad del aire en la cámara de electrospinning.

Los efectos de algunos de los parámetros citados en las nanofibras obtenidas, se recogen en la tabla 1. En este listado, se resume los efectos en la morfología de forma individual sobre las fibras, pero durante el proceso pueden existir interrelaciones entre ellos lo que lleva a complicaciones en el proceso de hilado. Por ello para encontrar las condiciones óptimas en cada caso será necesario realizar diversos experimentos variando los diferentes parámetros<sup>171,177</sup>.

**Tabla 1:** Parámetros operacionales y efectos en el electrospinning.

	<b>Parámetros</b>	<b>Efecto en la morfología de la fibra</b>
	<b>Peso molecular</b>	Es necesario un peso molecular alto para poder obtener fibras .
<b>Solución Polimérica</b>	<b>Concentración</b>	<p>La concentración está relacionada con la viscosidad.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A concentraciones muy altas se obtienen fibras de mayor grosor.</li> <li>- A concentraciones muy bajas no se obtienen fibras o aparecen de forma discontinua.</li> </ul>
	<b>Conductividad</b>	Una alta conductividad favorece la uniformidad de las fibras, un menor tamaño y menos defectos.
	<b>Tensión superficial</b>	Si la tensión superficial es alta crea inestabilidad en el haz con aparición de defectos.
<b>Equipo</b>	<b>Distancia Aguja-colector</b>	<p>Existe una distancia óptima para la obtención de fibras, que implica que a distancias más elevadas o más pequeñas se formen aglomeraciones.</p>
	<b>Velocidad de flujo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A elevada velocidad de flujo no permite la evaporación completa del disolvente.</li> <li>- A velocidades de flujo pequeñas permite un menor grosor de fibras.</li> </ul> <p>Velocidades de flujo entre 0.5-2 mL/h.</p>
	<b>Voltaje</b>	Un voltaje elevado implica mayor campo eléctrico que provoca estrechamiento de la fibra y favorece la evaporación del disolvente.
<b>Ambiente</b>	<b>Temperatura</b>	<p>La temperatura afecta directamente a la viscosidad de la disolución polimérica.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A una mayor temperatura disminuye la viscosidad y por tanto el diámetro de las fibras.</li> </ul>
	<b>Humedad relativa</b>	<p>Valores de humedad altos conducen a la formación de poros en las fibras.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A valores bajos, el disolvente puede evaporarse más rápido y obstruir la aguja.</li> </ul>

Si observamos la concentración de la disolución dentro de los parámetros de la solución, ésta es una de los factores determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la solución va a influir tanto en la viscosidad como en la tensión superficial de la disolución. La viscosidad de una solución polimérica está relacionada con el entrecruzado de las cadenas de los polímeros, si las cadenas son menos enredadas, la solución tendrá una viscosidad baja y viceversa. El diámetro de las fibras tiende a aumentar con el aumento de la viscosidad<sup>178</sup>. Si la solución está muy diluida las fibras de polímero se pueden llegar a romper en gotas antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial. De la misma manera, si la solución está muy concentrada, entonces las fibras no se podrán formar debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar de la aguja<sup>179,180</sup>.

Por otra parte, dentro de los parámetros del equipo; el voltaje es otro de los factores más importantes dentro del proceso de electrospinning. Algunos autores afirman que aplicar voltajes altos hace que más fluido se transporte en el chorro, lo que resulta en fibras con mayores diámetros<sup>177</sup>. Otros afirman que, un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras<sup>181</sup> y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (beads)<sup>180,182</sup>. Lo cierto es que, en la mayoría de los casos, un voltaje alto aplicado permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de Coulomb en el chorro. En general, este efecto promueve una reducción en el diámetro de las fibras<sup>183-186</sup>. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello, es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente.

Otra medida que está relacionada con el diámetro de la aguja, es el flujo de salida, que determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrospinning. Un flujo pequeño, podría ser beneficioso, ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras<sup>187</sup>. Si se incrementa ocurre un aumento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el número y tamaño de los defectos (aparición y/o formación de gotas)<sup>188,189</sup>. Un valor mínimo de volumen de solución a la salida del capilar debería mantenerse para obtener un cono de Taylor estable<sup>190</sup>.

Por último, dentro de los parámetros del equipo, se encuentra la distancia aguja-colector. Dependiendo de las propiedades de la disolución, el efecto de la variación de la distancia ejercer influencia en la producción de las fibras. Las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, si se trabaja con distancias muy grandes, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño<sup>191</sup>. Una distancia mínima se requiere para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector. Distancias muy grandes o excesivamente pequeñas, se ha observado la aparición de gotas (*beads*)<sup>192</sup> o fibras húmedas, que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas. La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la disolución, tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector<sup>193</sup>.

Hay que tener presente que el potencial eléctrico aplicado (kV) y la distancia que se recorre entre electrodos están directamente relacionados por un término físico como es la intensidad de campo eléctrico ( $V \cdot m^{-1}$ ), es decir, y son dos parámetros en uno que se tienen que optimizar cada vez que se preparan disoluciones. Por otra parte, la velocidad de flujo está íntimamente relacionada con el diámetro de la aguja. Debe haber un buen equilibrio entre estas propiedades

reológicas (viscosidad) y el paso por el capilar para producir un buen cono de Taylor.

En cuanto a los parámetros ambientales, Casper y col.<sup>194</sup> evaluó la influencia de la humedad en fibras de poliestireno obtenidas por electrospinning y demostró la aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras debido al aumento en la humedad. Al trabajar con alta humedad, el agua condensada en la superficie de las fibras, puede tener influencia en la morfología de las fibras especialmente cuando se trabaja con disolventes volátiles<sup>184,195</sup>. La humedad en el ambiente podría determinar la velocidad de evaporación del disolvente en la solución, a humedad relativa baja, un disolvente volátil podría evaporarse muy rápido. Por otra parte, la temperatura puede incrementar la evaporación del disolvente y puede ocasionar una reducción en la viscosidad de la disolución<sup>182</sup>.

Para evaluar la elaboración de las fibras mediante la técnica de *electrospinning* y poder caracterizarlas hay que centrar la atención en tres aspectos importantes<sup>171</sup>:

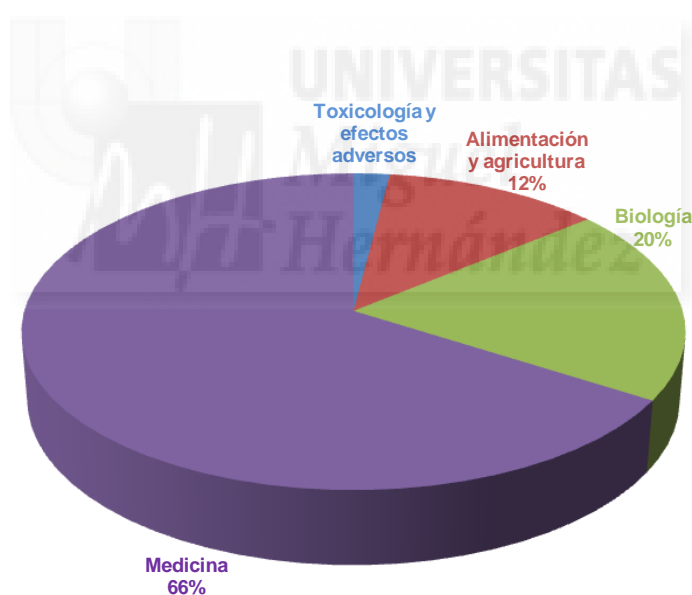
- I) Distribución monomodal: Los diámetros de las fibras obtenidas han de ser representativos y controlables.
- II) Ausencia de defectos: La superficie de las fibras no debe presentar defectos como formación de gotas.
- III) Fibras no amontonadas: hay que conseguir fibras aisladas, sin aglomeraciones para facilitar su posterior estudio y caracterización.



### 1.5. Aplicaciones generales de nanofibras

En una reciente búsqueda en la base de datos SciFinder sobre patentes relacionadas con nanofibras podemos encontrar 69000 citas, de las cuales un 23% son patentes y un 15% han sido desarrolladas en los últimos cinco años.

Del gran número de patentes existentes sobre *electrospinning* si se clasifican por sectores, la biotecnología aparece en el 80% de las patentes registradas en nanofibras, de las cuales un 66% se dedican al campo de la medicina, un 20% a la biología, un 12% a la alimentación y agricultura y aproximadamente un 2% en toxicología y efectos adversos. En la tabla 2, se describen algunas de las aplicaciones de las nanofibras según el sector.



**Figura 3:** Distribución de patentes dentro del campo de la biotecnología.

**Tabla 2:** Aplicaciones por sectores de las nanofibras poliméricas.

<b>Sectores</b>	<b>Aplicaciones</b>
Filtros	Sirven como membranas en las filtraciones de líquidos, gases y moléculas. Aplicaciones biomédicas: las fibras obtenidas se pueden utilizar para ser cargadas de fármacos de tal forma que se consigue una liberación controlada, en dispositivos hemostáticos y apósitos para la protección de heridas y quemaduras.
Aplicaciones industriales	Dentro de este campo se pueden emplear en dispositivos nano/microelectrónicos, en la disipación electrostática, en la protección de interferencias electromagnéticas, en celdas para dispositivos fotovoltaicos, en dispositivos LCD, en materiales ultraligeros para naves espaciales y en catalizadores de alta eficiencia y funcionalidad.
Prendas protectoras	Permite que estas prendas, tengan una impedancia mínima al aire, eficiencia para atrapar partículas en aerosol y que proteja de los gases bioquímicos.
Ingeniería de tejidos	Generación de membranas porosas para la piel, tubos para los vasos sanguíneos que también permiten la regeneración nerviosa y la producción de estructuras tridimensionales (matrices), con el objetivo de regenerar huesos y cartílagos.
Nanosensores	Se pueden emplear en sensores térmicos, piezoeléctricos y bioquímicos.
Mascarillas para la piel	Fabricación de cosméticos para la limpieza, curación y terapia médica.

### 1.5.1. Aplicaciones biomédicas

Hoy en día, las nanofibras fabricadas por *electrospinning* se están utilizando en una gran cantidad de aplicaciones biomédicas como lo demuestra el alto número de patentes registradas en los últimos cinco años. Algunas de las diferentes aplicaciones<sup>196</sup> serían las prótesis médicas, ingeniería de tejidos, protección de heridas y administración de fármacos.

En la última década, los implantes ortopédicos se han duplicado. Dentro de ellos, se incluyen los implantes articulares tales como cadera, rodilla, codo y también placas para reparar fracturas. Estos implantes, pueden provocar reacciones negativas en el huésped como pueden ser la inflamación, infección y dolor. Por tanto, hay que promover una buena integración del material de implante con el tejido huésped, para ello, se están desarrollando nuevas técnicas para revestir el implante con nanofibras. Estos recubrimientos se cargan con medicamentos (como los antibióticos) para prevenir la infección y otros materiales (como el PLGA) que se utilizan para mejorar la mineralización y la adhesión al tejido huésped. Algunas nanofibras se fabrican con materiales biodegradables y están diseñadas para promover la integración y luego absorberse en el tejido huésped cuando finalizan su trabajo<sup>186,197,198</sup>.

Otro de los sectores en los que estas nanofibras se están desarrollando es en la ingeniería de tejidos. Mediante un proceso llamado *Melt electrospinning* (electrohilado de fusión) para realizar impresión 3D de materiales biomédicos. En él, también se pueden fabricar estructuras fibrosas y andamiaje para reemplazar tejidos humanos o animales. En los últimos años, se ha dedicado mayor esfuerzo al diseño de estructuras con polímeros sintéticos biocompatibles que puedan imitar las estructuras biológicas, y emplearse para diseñar tejidos de electrohilado y fabricados por el

hombre que promueven la regeneración de tejidos y el crecimiento de células sanas<sup>199</sup>. Para que la adhesión de las células y proliferación de las células se vea favorecida es necesario que los diámetros de las fibras sean menores que los de éstas<sup>200</sup>.

Las nanofibras también son usadas en protección de heridas o quemaduras en la piel. Para evitar la formación de cicatrices e infecciones bacterianas, las nanofibras se pueden disponer en capas poliméricas o bien se pueden incorporar nanopartículas con fármacos dentro de las fibras y poder tratar a los enfermos. De esta manera se impulsa el crecimiento de la piel y se evita la formación de cicatrices y posibles infecciones. Este método se ve limitado por las diferencias de tratamiento que requieren hueso y piel, ya que no se puede utilizar el mismo tipo de fibra para ambos casos<sup>201,202</sup>.

Por último, las nanofibras tienen cada vez más importancia en la administración y liberación de fármacos. La distribución de medicamentos en los seres vivos, depende de la distribución de estos en el organismo, según sus propiedades físicas como solubilidad, coeficiente de partición y carga. Debido a esto los fármacos pueden alcanzar tejidos y órganos que no lo necesiten. Además, en muchos de ellos, es posible que estén fuera del intervalo terapéutico, que sean inactivos o que su acción sea indeseada o nociva y, por ello, cause efectos secundarios negativos<sup>203,204</sup>. En la actualidad, la administración de sustancias activas se realiza conjuntamente con otras sustancias que mejoran su funcionamiento. Estas sustancias llamadas coadyuvantes, en la mayoría de casos son de naturaleza polimérica. Existen dos metodologías generales de liberación para optimizar la acción de los fármacos:

- Liberación controlada: trata de eliminar o reducir los efectos secundarios produciendo una concentración terapéutica óptima para el organismo. Generalmente, se intenta que los cambios en la concentración del fármaco en el organismo sean nulos, es decir que su cinética de liberación sea de orden cero.
- Liberación dirigida: trata de que el fármaco se dirija a lugares específicos de manera que se asegura la liberación de éste en el lugar requerido, al mismo tiempo se mantiene el fármaco inactivo en cualquier otro lugar del organismo.

El diseño de la administración de medicamentos permite definir diferentes tipos de respuesta. Normalmente, la absorción de medicamentos en el cuerpo humano es mejor si éstos son pequeños y si la capa de recubrimiento es fina. La administración de sustancias activas, se rige con el principio que cuanto mayor sea la superficie del medicamento y de la estructura que lo soporta, mayor será la velocidad de disolución.

Desde el punto de vista de las nanofibras, la administración de medicamentos se puede enfocar desde tres diferentes puntos de vista<sup>205</sup>.

- 1) Las partículas del fármaco se incorporan a la superficie de las nanofibras que sirven de matriz.
- 2) Tanto el medicamento como la matriz, se encuentran en forma de nanofibras y el producto resultante está formado por los dos tipos de fibras entrelazadas.
- 3) La mezcla conjunta del medicamento y del soporte en un solo tipo de fibras. La matriz se dispone por medio de *electrospinning* en

formas tubulares y las partículas del medicamento se encapsulan en su interior.

### **1.6. Administración transdérmica**

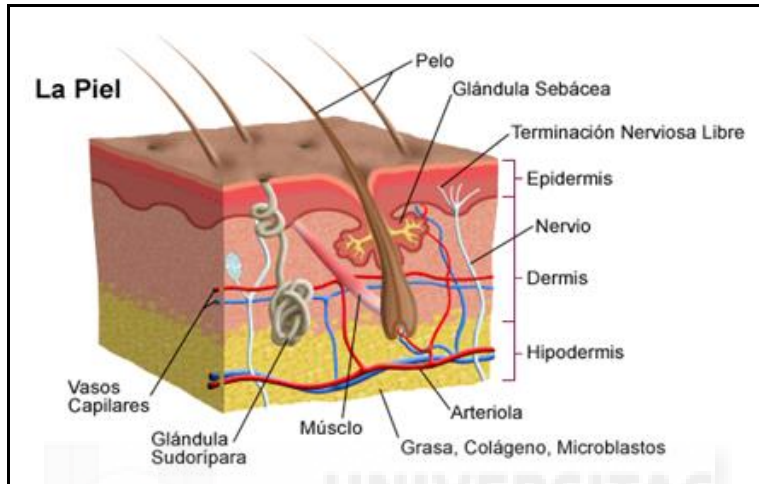
La vía de administración tópica, presenta una serie de barreras diferentes a otras vías de administración que condicionan la administración de fármacos. La piel, es el epitelio más impermeable a todas las sustancias exógenas y una de las barreras que forman parte de la inmunidad innata. Es el órgano más extenso del cuerpo humano y presenta una superficie total aproximada de 1,7 m<sup>2</sup>, casi un 10% del peso corporal.

Este órgano, debido a su composición, se encarga de mantener la homeostasia de los fluidos corporales, regular la temperatura corporal, proteger al individuo de agresiones externas, establecer las relaciones sensoriales y mantener la forma del cuerpo.

La piel está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis, de más externa a más interna (figura 4). Cada capa tiene su función, la epidermis es más protectora y ahí se encuentra el estrato córneo que se considera la barrera más importante de la permeación de fármacos <sup>206</sup>. La dermis, presenta una función de nutrición y sostén termorregulador y la hipodermis de protección y reserva. Su estructura la hace resistente frente a la administración de fármacos y por ello limita el número de sustancias biológicamente activas capaces de proporcionar concentraciones plasmáticas eficaces.

La penetración del principio activo dependerá de: I) factores físico-químicos del fármaco (concentración, solubilidad, coeficiente de difusión y coeficiente de reparto) y del vehículo. II) biológicos (edad,

zona corporal, estado patológico, grado de hidratación y flujo sanguíneo).



**Figura 4:** Estructura de la piel<sup>207</sup>.

Cuando un fármaco se administra sobre la piel en primer lugar debe disolverse en la capa superficial de la misma y si se absorbe accederá a la red de vasos capilares que irriga la dermis.

Hay dos vías de penetración: I) vía transepidérmica: por los espacios intercelulares. La mayoría de medicamentos utilizan esta forma de atravesar la piel y lo pueden realizar por dos vías: transcelular e intercelular<sup>206</sup> o II) vía transapédicular: por las glándulas sudoríparas y los folículos polisebáceos<sup>208</sup>.

Esta última vía de administración, está siendo cada día más pensada para diversos tratamientos debido a que es una manera de administración de fármacos que evita metabolismo de primer paso y ciertos efectos adversos que pueden provocar otras vías de administración.

En la actualidad, está en auge el estudio de tratamientos mediante terapia fotodinámica (TFD). Este tipo de administración de fármacos se emplea en pacientes con enfermedades neoplásicas utilizando el profármaco 5-ALA. El objetivo de este trabajo será desarrollar y aplicar las nanofibras con dicho profármaco, para potenciar un tratamiento más eficaz.

La segunda generación de fotosensibilizadores forma la clave del desarrollo de la terapia fotodinámica y entre ellos el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) ha sido uno de los referentes en muchos de estos tratamientos. Precisamente la administración de éste y otros fármacos de segunda generación ha supuesto el estudio de la tercera generación de fotosensibilizadores en problemas de administración por su baja solubilidad que limitan su uso.

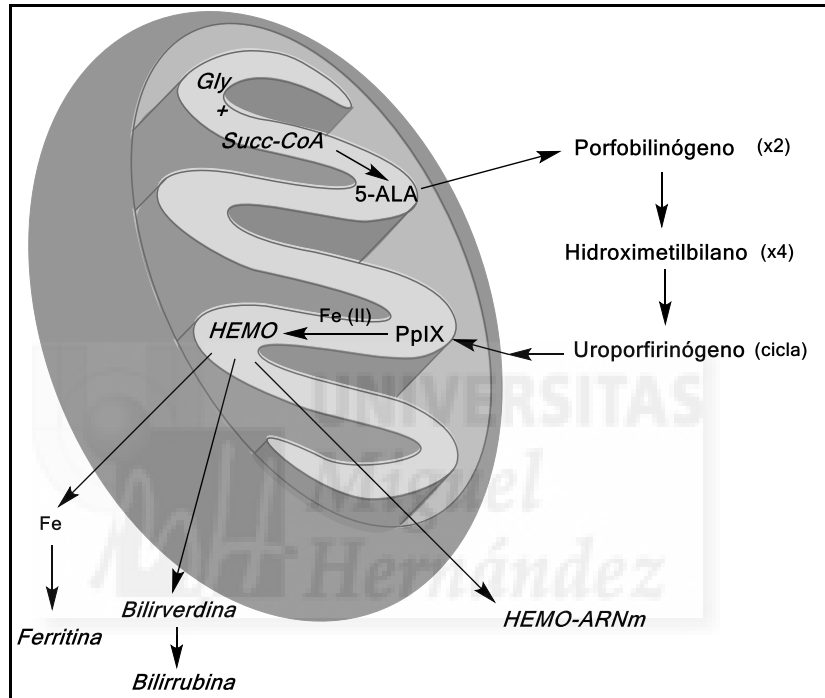
### 1.7. Agente neoplásico y terapia fotodinámica

El ácido 5-amino-4-oxo-pentanoico (figura 5) también denominado ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), procede de la síntesis de succinil coenzima A y glicina mediada por la enzima ALA sintetasa. El 5-ALA es el compuesto que inicia la vía de las porfirinas en la biosíntesis del grupo hemo, cofactor de la hemoglobina. Debido a la condensación de moléculas de 5-ALA, se forma una estructura tetrapirrólica, la protoporfirina IX (PpIX). Esta estructura, es capaz de formar compuestos de coordinación del ión de hierro (+2) con el anillo de porfirina generando la estructura HEMO<sup>209,210</sup> (figura 5).

Como agente terapéutico, el ácido 5-aminolevulínico es un profármaco que *in vivo* se bioactiva a PpIX. La PpIX es un compuesto fluorescente y fotoactivo que se acumula en estructuras intracelulares, principalmente en las mitocondrias. Aquí, mediante mecanismos



oxidativos, la PpIX induce la formación de especies reactivas de oxígeno (oxígeno singlete) y radicales libres, que producen daño celular y finalmente la muerte de las células afectadas por apoptosis<sup>211</sup>.

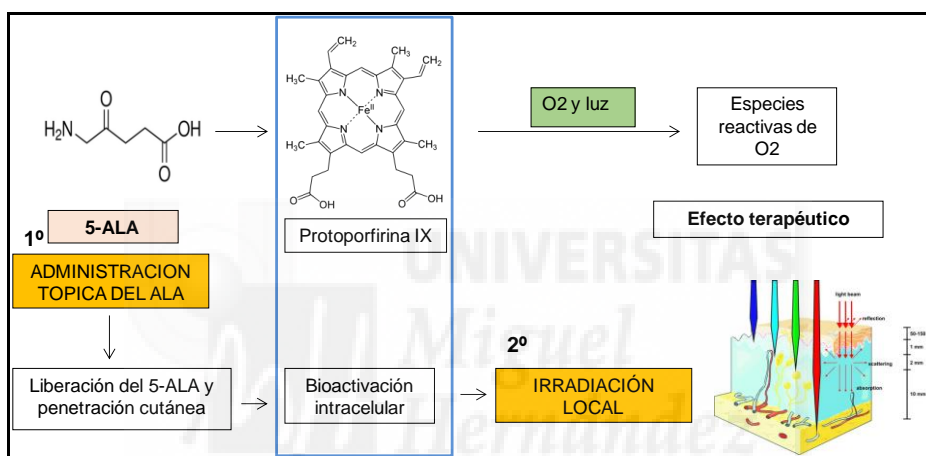


**Figura 5:** Mecanismos bioquímicos del 5-ALA implicados en la producción del grupo HEMO.

La selectividad del 5-ALA se basa en que se acumula y bioactiva con más fuerza a las células hiperproliferativas, su diana terapéutica. Este profármaco, se administra localmente por vía tópica, directamente sobre las lesiones cutáneas.

La exposición a luz puede activar la generación de radicales de  $O_2$ . Dependiendo del tipo de luz con el que se irradie, tendrá mayor o

menor efecto ya que la luz con menores longitudes de onda (azul) tienen menor penetración en la piel que las de mayor longitud de onda (roja). La TFD con ácido 5-aminolevulínico se utiliza habitualmente en la práctica clínica en dermatología para el tratamiento de lesiones cutáneas como acné, queratosis actínica, carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas *in situ* (enfermedad de Bowen) (figura 6).



**Figura 6:** Mecanismo terapia fotodinámica del 5-ALA junto niveles de penetración de distintos tipos de irradiación de luz <sup>209</sup>.

La eficacia antitumoral de la TFD con 5-ALA está mediada, además de por la fototoxicidad, por sus propiedades antiangiogénicas, actuando sobre la neovascularización tumoral, y por la activación del sistema inmune, aumentando su respuesta antitumoral. Estos dos mecanismos de acción contribuyen a disminuir las recurrencias tumorales y la aparición de metástasis<sup>210,212</sup>.

En una conferencia realizada en colaboración con Hospital General de Elche (octubre 2016), se explicó como se está comprobando que la acción de la fototerapia en pacientes del hospital con fístulas ciegas incompletas (conexión sobre la piel) sometidos a cirugía no invasiva con 5-ALA seguido de aplicación de luz según protocolos de fototerapia, obtienen resultados muy prometedores en la cura y recuperación de la patología<sup>213</sup>.

Otra característica a evaluar con respecto a las formulaciones tópicas de 5-ALA, es cómo se produce la liberación del principio activo desde la forma farmacéutica. En la TFD la administración del fotosensibilizador es sólo el primer paso y, a fin de aumentar la eficacia terapéutica, se requiere que la liberación del 5-ALA sea rápida para que la mayor cantidad posible penetre en las lesiones cutáneas antes de que se lleve a cabo la irradiación con luz.

El profármaco 5-ALA, difunde con dificultad a través del estrato córneo de la piel por su elevada hidrofilia y, por tanto, su absorción sistémica es casi nula. Gracias a esto apenas produce toxicidad sistémica, salvo una leve fotosensibilidad, y se puede emplear convenientemente sobre lesiones superficiales, como el acné o la queratosis actínica. Sin embargo, derivados más lipófilos como el MET pueden penetrar mejor en la piel y, por ello, son utilizados en el tratamiento del carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas *in situ*.

El ácido 5-aminolevulínico y sus derivados (MET: aminolevulinato de metilo, HEX: hexaminolevulinato) también se pueden emplear para la señalización de células hiperproliferativas, lo que facilita el diagnóstico y proporciona orientación para el tratamiento. Esta técnica se basa en la detección de la fluorescencia de la PpIX acumulada intracelularmente en las lesiones. En España

está autorizada para su uso en tumores cerebrales y cáncer de vejiga. En la siguiente tabla (tabla 3), se pueden apreciar las distintas marcas comerciales y sus aplicaciones en clínica.

**Tabla 3:** Fármacos comercializados en España con diferentes aplicaciones terapéuticas.

Grupo terapéutico	Marca registrada	Fármaco	Aplicaciones terapéuticas
Antineoplásicos aplicados en TFD	Ameluz® gel	5-ALA	Queratosis actínica
	Metvix® crema	MET	Queratosis actínica, carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas <i>in situ</i>
Agentes diagnósticos	Gliolan® solución oral	5-ALA	Visualización de tejidos malignos durante la cirugía del glioma maligno
	Hexvix® solución intravesical	HEX	Cistoscopia de fluorescencia con luz azul para el diagnóstico y manejo del cáncer de vejiga

Por otra parte, la eficacia de la TFD con 5-ALA en lesiones más profundas como el melanoma se encuentra limitada por la baja biodisponibilidad intracelular del fotosensibilizador tras la administración tópica. Para mejorar este inconveniente se están

desarrollando varios campos de actuación. Entre esas soluciones, se encuentra el desarrollo de derivados del 5-ALA con una mayor lipofilia (profármacos como ésteres o péptidos)<sup>214</sup> y también la fabricación de nuevas formas farmacéuticas tipo nanogeles o nanopartículas, que y así, poder mejorar la penetración cutánea del fotosensibilizador<sup>215</sup>.

La terapia fotodinámica (TFD) con 5-ALA, se realiza mediante dos pasos: en primer lugar, se administra el fotosensibilizador, y a continuación se irradian las lesiones con la dosis de luz ( $J/cm^2$ ) adecuada. Normalmente mediante una fuente de luz roja de espectro estrecho (630 nm) o más amplio y continuo (570-670 nm). Asimismo, para la administración del 5-ALA por vía tópica, se requiere realizar un vendaje oclusivo de la zona de aplicación que se mantiene durante diferentes tiempos dependiendo de tratamientos y líneas celulares. Transcurrido este tiempo, necesario para acumulación intracelular del fotosensibilizador, se lleva a cabo la irradiación lumínica (figura 7).

La TFD, como se observa en la figura, consiste en la aplicación tópica del profármaco, liberación del mismo y activación de la protoporfirina IX. Esta PIX provocará radicales de oxígeno mediante aplicaciones de irradiación de luz con diferentes longitudes de onda dependiendo del tratamiento y producir el efecto terapéutico.

Desde este punto de vista, del objetivo de este capítulo, ha sido emplear los materiales utilizados previamente para fabricar nanopartículas que pudieran ser estructurados como nanofibras para obtener parches transdérmicos en aplicaciones biotecnológicas.





## **Material y métodos**



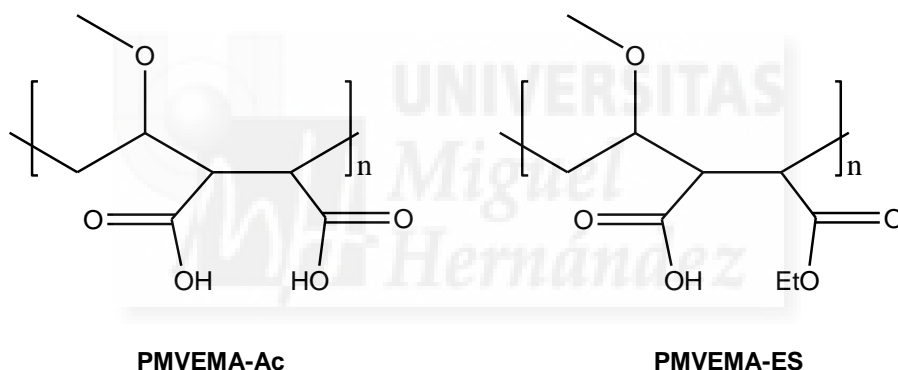


## 2. Material y métodos

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Polímeros transportadores

En la elaboración de las nanofibras, se utilizaron dos derivados del PMVEMA: poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-Ac) con  $M_w = 216000$  g/mol y poli(metil vinil éter-*alt*-monoéster ácido maleico) (PMVEMA-ES) con  $M_w = 130000$  g/mol (calculados por dispersión de luz). Ambos se utilizaron como matrices poliméricas y fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



**Figura 7:** Estructura química de las matrices poliméricas utilizadas en la fabricación de nanofibras.

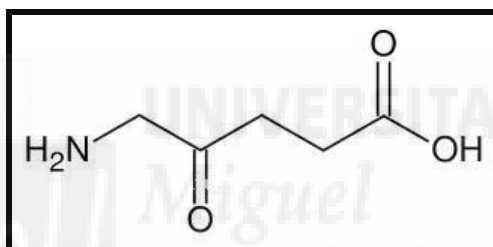
#### 2.1.2. Polielectrolitos señalizadores

Se utilizaron los polielectrolitos conjugados descritos en el capítulo anterior: los bromuros de poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)-hexilo]-2,7-fluoreno-*alt*-1,4-fenileno} (PFP<sup>+</sup>), emisor azul, lote  $M_w = 8340$  g/mol,  $M_u = 694$  g/mol y polidispersión (PDI) de 2,00 (calibración estándar por GPC: PS) y poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-fluoreno-*alt*-naftaleno-[2,3c]-1,2,5-tia-diazol}

(PFNT<sup>+</sup>), emisor rojo, lote  $M_w = 8990$  g/mol,  $M_u = 716,17$  g/mol y PD = 1,99 (calibración estándar por GPC: PS) ambos sintetizados y caracterizados en nuestro laboratorio<sup>62</sup> (figura 5, sección 2.1.2 del capítulo III).

### 2.1.3. Antineoplásico

El ácido 5-amino-4-oxopentanoico fue adquirido en Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) en forma de sal, ácido 5-aminolevulínico clorhidrato con un grado de pureza superior al 97%.



**Figura 8:** Estructura química del ácido 5-amino-4-oxo-pentanoico (5-ALA).

### 2.1.4. Otros reactivos

Los disolventes empleados, etanol y DMSO con purezas superiores al 99% y los disolventes grado HPLC, acetonitrilo y TFA, se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

El agua bidestilada y desionizada (DDW) proviene de un sistema Milli-Q Synthesis A10 (Millipore, Madrid, Spain).

### **2.1.5. Cultivos celulares**

Para los ensayos biológicos *in vitro* de este capítulo, se utilizaron la línea celular HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados proporcionada por el Prof. Antonio Ferrer y la línea celular de tejido colorectal SW480 (ATCC® Ref.: CCL-228™) cedida por el Dr. Miguel Saceda. Para su crecimiento y mantenimiento se utiliza el medio celular previamente descrito en la sección 2.1.5.1 del capítulo III. Se cultivó en frascos de 25cm<sup>2</sup> a 37°C con aporte de aire y 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.2. Instrumentación y metodología**

### **2.2.1. Preparación de las disoluciones para la preparación de nanofibras**

#### **2.2.1.1. Disoluciones madre poliméricas**

En la fabricación de nanofibras se realizaron dos disoluciones madre de los polímeros que van a actuar como matriz polimérica. Para el derivado ácido, PMVEMA-Ac, se realizó una disolución al 20% p/p en agua (20 g en 100 mL)<sup>216</sup>. Para PMVEMA-ES se preparó una disolución madre al 25% p/p en etanol partiendo de la disolución comercial al 50% p/p en etanol. Ambas soluciones, permanecieron en agitación constante (300 rpm) durante una hora y a temperatura ambiente.

### **2.2.1.2. Disoluciones madre poliméricas con polielectrolitos conjugados**

Las disoluciones con los polielectrolitos se prepararon disolviendo 7,5 mg de PFP<sup>+</sup> o PFNT<sup>+</sup> en 10  $\mu$ L de DMSO y, a continuación, hasta 1 mL de las disoluciones madre poliméricas para obtener una concentración final de polielectrolitos conjugados de 0,75% p/p. La mezcla se mantuvo en agitación magnética constante 300 rpm, temperatura ambiental y en oscuridad durante 20 horas para el PFP<sup>+</sup> y 48 horas para el PFNT<sup>+</sup>.

### **2.2.1.3. Disoluciones madre poliméricas con 5-ALA**

Para la síntesis de nanofibras con 5-ALA, las disoluciones se prepararon recientes para ser usadas y en oscuridad, para evitar su degradación. El ácido 5-ALA se disolvió en agua a una concentración de 1 mg/mL y se añadió hasta alcanzar una concentración de 33,2 mg/mL ó 41,5 mg/mL de PMVEMA-Ac o PMVEMA-ES, respectivamente. Equivalente a una carga del 16,6% p/p de 5-ALA respecto a la cantidad del polímero derivado de PMVEMA. El conjunto se mantuvo en agitación magnética (300 rpm) durante 2 horas y temperatura ambiente.

### **2.2.1.4. Disoluciones madre poliméricas con polielectrolitos conjugados y 5-ALA**

Las disoluciones madre poliméricas con PFP<sup>+</sup> o PFNT<sup>+</sup> 0,75% p/p y 5-ALA 16,6% p/p, respecto al polímero derivado de PMVEMA, se realizaron, procediendo del mismo modo que en los apartados anteriores.

Todas las disoluciones cargadas con polielectrolitos conjugados y/o 5-ALA, se mantuvieron preservadas de la luz y a temperatura ambiente hasta su manejo.

### 2.2.2. Elaboración de nanofibras mediante electrohilatura

Las nanofibras poliméricas se elaboraron mediante la técnica de electrohilatura o *electrospinning* en las mismas condiciones experimentales optimizadas previamente en el laboratorio<sup>216</sup>: Voltaje aplicado: 15 kV, distancia aguja-colector: 10 cm y flujo de bombeo: 0,25 mL/h. Se registraron las condiciones ambientales en que se realizó el *electrospinning*, manteniéndose la temperatura entre 20-25 °C y la humedad ambiental entre el 35-60%.

La disolución polimérica se introdujo en una jeringa Plastipak 2 mL (Becton Dickinson) y se bombeó a través de una aguja de acero inoxidable 316, calibre 20 y longitud 101,6 mm (Sigma-Aldrich) con un flujo (0,25 mL/h) controlado por una bomba de infusión kdScientific 100. La aguja y el colector estuvieron a una distancia establecida de 10 cm y conectados a una fuente de alta tensión Series FC (Glassman High Voltage, Inc), que aplica el voltaje responsable de la aparición del *jet* (15 kV). La evaporación del disolvente a lo largo del *jet* origina la formación de las nanofibras, que se depositan sobre el colector.

En la figura 9 se muestra la configuración horizontal del equipo de *electrospinning* de fabricación casera. Este montaje se encuentra en el interior de una campana de extracción de gases dispuesto conforme a las reglas y normativas de seguridad de la UMH.



**Figura 9:** Configuración del equipo de *electrospinning*.

Los elementos que constituyen el equipo que se utilizó para realizar la técnica de *electrospinning* en el laboratorio, son: una bomba de infusión modelo “kdScientific 100”, elemento electrónico que actúa sobre el émbolo de la jeringa mediante el movimiento de un pistón. Este componente del equipo, permite la dosificación de la disolución polimérica hasta la aguja con flujo constante. La bomba empuja el émbolo de la jeringa de manera constante según la velocidad que se haya programado y dependiendo del tipo de jeringa utilizada (figura 10).



**Figura 10:** Bomba de infusión “kdScientific 100”

Otro elemento que forma parte del equipo, es la jeringa, modelo Becton Dickinson Plastipak de 2 mL. Este elemento se utiliza para almacenar e inyectar la disolución polimérica. Debe de ser inerte a ésta y no causar alteraciones que cambien su naturaleza, además, tiene un diámetro conocido para que pueda ser empleada en la bomba de infusión. Esta jeringa va conectada a una aguja, en este caso de de acero inoxidable 316 (Z261335-1EA) de Sigma-Aldrich, longitud 101,6 mm, calibre de aguja 20 (Diámetro externo 0,902 mm y Diámetro interno 0,584 mm). Esta aguja, se utiliza para hacer fluir la disolución a la vez que se le conecta uno de los electrodos de la fuente de tensión. Del extremo de la aguja sale la disolución polimérica en forma de gota estirada, cono de Taylor, que va formando una fibra hilada.

El colector en este caso es una hoja fina de aluminio de varias micras (5-20  $\mu\text{m}$ ) que sirve para envolver la forma final sobre la que se depositan las fibras y poder conducir la electricidad ya que está conectada al electrodo negativo de la fuentes de alimentación, que es donde se acumularán las fibras obtenidas. La fuentes de alta tensión empleada es de la marca Glassman High Voltage Inc. y modelo "FC60P2". Este aparato se encarga de generar la diferencia de potencial entre la aguja y el colector, creando un campo eléctrico para formar las fibras (figura 11).



**Figura 11:** Fuente de alta tensión Glassman High Voltage Inc.

Para completar el equipo, se utilizó una cinta métrica y una caja protectora. La cinta métrica, se empleó para medir la distancia entre la aguja y el colector y la caja protectora, realizada de metacrilato, se dispuso para aislar el montaje durante el *electrospinning*, de manera que se evite el contacto directo con la persona que manipula. El voltaje durante el *electrospinning* es de alta tensión, lo que hace que la caja protectora sea un elemento de seguridad necesario. Para mayor seguridad, los experimentos se realizaron dentro de una vitrina para evitar el contacto de cualquier persona ajena.

La manipulación de las nanofibras es diversa en función de la aplicación o del análisis a realizar. Directamente en portaobjetos para su análisis mediante microscopía óptica, espectroscopia de fluorescencia, en rejillas para microscopia electrónica, también puede recogerse directamente del colector para FTIR, HPLC o para los ensayos con celdas de Franz, o incluso sobre parches transparentes de poliuretano empleados en dermatología.



### **2.2.3. Microscopía óptica de fluorescencia**

Las imágenes de microscopía de las nanoestructuras se emplearon para valorar de una forma rápida el grado de homogeneidad a la hora de la incorporación de los polielectrolitos conjugados, así como la visualización de la morfología de las nanofibras. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio óptico de fluorescencia Leica DMI 3000 B invertido equipado con una fuente de luz compacta EL6000 y una cámara digital Leica DFC3000G. Se obtuvieron imágenes de contraste de fases y de fluorescencia, así como la superposición de ambas para resaltar la localización de zonas fluorescentes. Los datos fueron monitorizados y procesados manualmente utilizando la aplicación Leica Suite AF6000 Module Systems.

### **2.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), modelo JEO 6100 (Jeol, Japan) es un instrumento que utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía sobre la superficie de una muestra sólida para generar una variedad de señales. Las señales derivadas de las interacciones de la muestra con los electrones revelan información acerca de esta, como por ejemplo la morfología o la composición química.

Algunas de las propiedades más significativas de este tipo de microscopía son: I) obtención de imágenes en apariencia tridimensional II) su gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque una gran parte de la muestra y III) gran versatilidad, al no atravesar las muestras como en el caso del TEM esta microscopía puede aplicarse a mayor número de muestras.

### **2.2.5. Microscopía óptica de transmisión (TEM)**

El tamaño y morfología de las nanofibras fueron analizadas con un microscopio Jeol 1011 (Jeol, Japan), a diferentes kV para acelerar un haz de electrones, que colisiona con una muestra delgada (ver sección 2.2.4.). Para la preparación de las muestras, las nanofibras fueron depositadas directamente durante el proceso de *electrospinning* en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro (portaobjetos adecuados para microscopía electrónica) de Electron Microscopy Sciences (Hatfield).

### **2.2.6. Análisis por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)**

La técnica del FT-IR se basa en la absorción de radiación infrarroja a una determinada longitud de onda, a partir de la excitación de los modos de vibración y subestados de rotación de las moléculas que provocan un cambio en su momento dipolar. Es posible asignar absorciones a grupos funcionales específicos y obtener un espectro de IR diferente para cada molécula.

El análisis mediante espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR), permite realizar un estudio cualitativo de la muestra determinando los grupos funcionales que la constituyen. El equipo utilizado para realizar este análisis es un “*Espectrofotómetro FTIR Bruker IFS 66/S*” y equipado con el software OPUS 5.5 para tratamiento de los datos.

La preparación de las muestras consistió en:

- Para el análisis de materiales en polvo, se prepararon pastillas de bromuro potásico (KBr) mezclado con la sustancia a analizar.
- Para el análisis de las fibras de PMVEMA-Ac o PMVEMA-ES, se recogió con ayuda de unas pinzas, trozos de fibras o velos depositados en un portaobjetos. Estos trozos se colocaron directamente sobre un soporte de sujeción para su análisis espectral.

### 2.2.7. Espectroscopia de fluorescencia en estado sólido

Al igual que en capítulo anterior, las muestras que contienen polielectrolitos señalizadores son analizados por fluorimetría. Este equipo es capaz de medir intensidades de fluorescencia de forma modular y para diferentes tipos de muestras en estado sólido. El espectrofotómetro de fluorescencia en estado estacionario continuo QuantaMaster (Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA) (PTI) es el mismo que el utilizado en nanopartículas, pero en este caso para muestras sólidas. Este equipo dispone de un soporte adaptado para muestras en estado sólido, permitiendo así el estudio de fluorescencia de las nanofibras. Para su análisis, las nanofibras poliméricas se elaboraron mediante *electrospinning* y se recogieron directamente sobre un portaobjetos de vidrio. Éste se colocó en la peana giratoria (figura12), inmovilizándolo con dos abrazaderas metálicas reguladas por sendos tornillos con rosca.



**Figura 12:** Soporte para muestras en estado sólido (peana giratoria).

En este dispositivo, se pueden regular dos parámetros del soporte: el ángulo de incidencia de la luz sobre la muestra ya que el soporte es giratorio y la distancia con la muestra mediante un tornillo micrométrico. Estos parámetros se pueden optimizar hasta obtener un valor recomendable, que se corresponde con el máximo de emisión de fluorescencia de las nanofibras. Para las muestras analizadas en esta tesis, los mayores recuentos de fluorescencia se obtuvieron a  $340^\circ$  y 3,25 mm, por lo que la espectroscopia de fluorescencia de las nanofibras que contenían PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> se realizó en esas condiciones.

### 2.2.8. Estudios de permeabilidad en piel

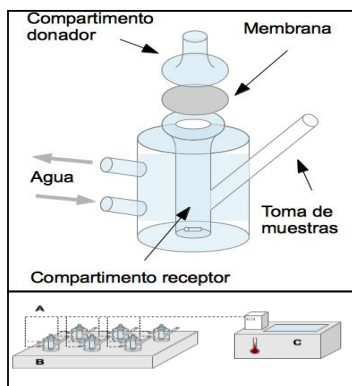
Para realizar un estudio *in vitro* y estudiar la liberación del 5-ALA de las nanofibras poliméricas sintetizadas para administración tópica, se utilizaron las llamadas celdas de Franz o celdas verticales (figura 14). Como referencia, se recurrió a una formulación semisólida convencional que es la disolución polimérica viscosa con 5-ALA a

partir de la cual se elaboraron las nanofibras. De esta forma, se puede comparar los resultados entre las nanofibras y la disolución con la que se fabricaron.

Esta metodología es la más utilizada para evaluar *in vitro* la cinética de liberación y absorción de formas farmacéuticas de administración tópica. Para la estandarización de estos estudios por vía tópica<sup>217</sup> normalmente se siguen las guías SUPAC-SS de la FDA<sup>218</sup>, en el caso de los ensayos de liberación *in vitro*, y el test 428 de la OECD<sup>219</sup>, para la permeabilidad *in vitro* o absorción transdérmica.

Las celdas verticales constan de un compartimento donador, donde se dispone la formulación a estudiar, separado por una membrana del compartimento receptor, que contiene el medio de disolución y un brazo por donde se realiza la toma de muestras. Las celdas incorporan una cámara exterior por la que circula agua para mantener el sistema receptor a 32 °C, la temperatura de la piel humana y, además, disponen de agitación magnética en el compartimento receptor.

Los ensayos de liberación se realizaron con membranas de acetato de celulosa Cuprophan® (Medicell) y celdas de Franz (PermeGear®) con cámara exterior, orificio de 9 mm (0,64 cm<sup>2</sup>) y un volumen receptor de 5 mL. El sistema consta de seis celdas de Franz sobre un agitador magnético (IKA Laboratory Equipment) que se mantuvo a 600 rpm durante todos los ensayos y conectadas a un baño termostático (Selecta Digiterm-100) regulado a una temperatura de 32,0 ± 0,5 °C (figura 13).



**Figura 13:** (A) Celdas de Franz. (B) Agitador magnético. (C) Baño termostático.

Las membranas se recortaron en función del tamaño del orificio de la celda ( $d=9$  mm) y se sumergieron en el medio de disolución para homogeneizarlas. Las celdas se rellenaron de medio tampón fosfato 1 mM ( $\text{pH}=7$ ) y el sistema se mantiene a  $32,0 \pm 0,5$  °C, a continuación, se colocaron las membranas previamente tratadas entre el compartimento donador y receptor. Se cerró el sistema mediante una pinza metálica y se dejó estabilizar durante al menos una hora.

El ensayo se inicia colocando las muestras de nanofibras con 5-ALA en el compartimento donador. Seguidamente, se tomaron volúmenes conocidos del compartimento receptor ( $400$   $\mu\text{L}$ ) a diferentes tiempos, según el diseño del ensayo consumiendo hasta un tiempo total de 4 horas. Tras las extracciones, el volumen se repone de nuevo con tampón fosfato 1 mM. Este muestreo altera la concentración de 5-ALA en el compartimento receptor al retirar un volumen de medio con 5-ALA, por lo que se corrigió posteriormente. El análisis cinético de cada muestra (nanofibras y disolución de partida) se realiza en tres celdas, es decir, por triplicado para asegurar un adecuado tratamiento estadístico. Las muestras no requirieron tratamiento previo para su determinación que se realizó mediante

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las alícuotas extraídas de cada ensayo se analizaron a medida que se extraían para evitar la degradación del 5-ALA.

### **2.2.9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

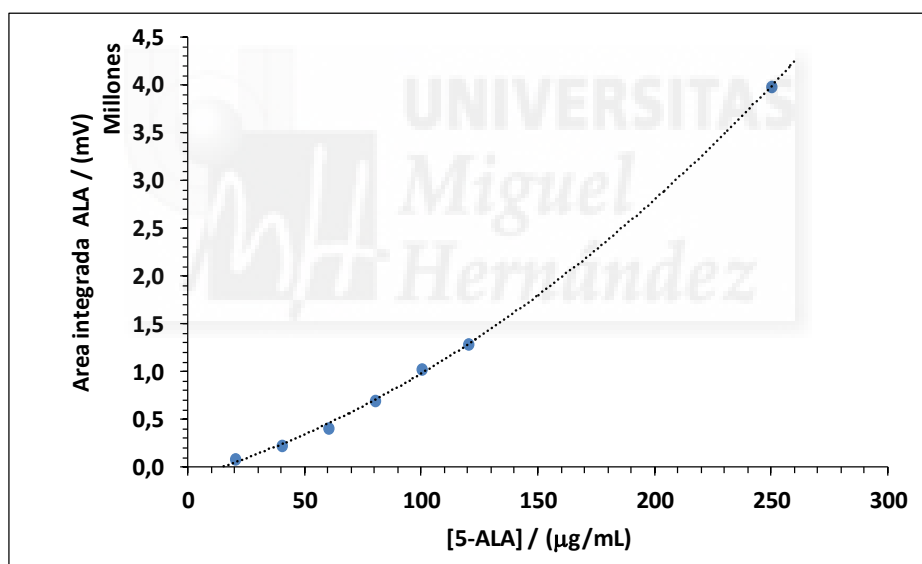
El equipo utilizado para el análisis del 5-ALA, fue un HPLC Hitachi (Merck Hitachi LaChrom) que consta de una bomba L-7100, un detector automático L-7200, horno para la columna y acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) Alltech 3300 (Grace Davison Discovery Sciences). Los datos fueron analizados utilizando el software D-7000 HSM, combinación de los equipos de HPLC A y C (detector ELSD) descritos en metodología del capítulo III, sección 2.2.6.

El método empleado es una modificación del descrito por V. Armoskaite y col.<sup>220</sup>. Aquí, se aplicó un método isocrático cuya fase móvil fue un 98% de agua con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v y un 2% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v, a un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10  $\mu$ L. Las condiciones para el detector evaporativo fueron: presión de nitrógeno de 3,5 bares, temperatura de evaporación 45 °C y la ganancia del detector de 16. El tiempo de análisis requerido en cada muestra fue de 5 minutos.

La cantidad de 5-ALA se calibró a partir de las áreas de integración obtenidas mediante HPLC-ELSD. Con estos datos experimentales se realizaron diferentes ajustes de ácido 5-aminolevulínico en tampón fosfato 1 mM (pH=7) entre las concentraciones 0,02-0,25 mg/mL (ver tabla 4).

**Tabla 4:** Comparación de los diferentes ajustes en la calibración de 5-ALA por HPLC (ELSD).

Tipo de curva	Ecuación	R <sup>2</sup>
Exponencial	$y = 139006e^{0,015x}$	0,846
Lineal	$y = 17425x - 568221$	0,978
Log-Log	$y = 1,5578x + 2,8705$	0,998
<b>Cuadrática</b>	$y = 36,5920x^2 + 7.231,0431x - 109.497,6502$	<b>0,999</b>



**Figura 14:** Curva de calibrado del 5-ALA, empleada para realizar los estudios de cinética de liberación.



Con los datos obtenidos, se observó que tanto el ajuste de doble logaritmo como el ajuste cuadrático son la mejor elección de acuerdo con los mayores valores del coeficiente de regresión <sup>221</sup>, y ligeramente mejor el cuadrático ( $R^2= 0.999$ ) con una ecuación  $y = 36,592x^2 + 7231x - 109498$ , que también coincide con el ajuste de calibración realizada por V. Armoskaite y col. La ecuación cuadrática anterior se empleó en los ensayos de liberación *in vitro* para el cálculo de las concentraciones de 5-ALA en los compartimentos receptores para cada alícuota a partir del área integrada de 5-ALA en el HPLC.

#### **2.2.10. Ensayos de citotoxicidad**

Se analizó la toxicidad en las líneas celulares descritas en el apartado 2.1.5 (HaCat y SW480) de todas las combinaciones de nanofibras, así como de sus componentes individualmente, midiendo los cambios en la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5-difeniltetrazol) ya descrito en el capítulo III (sección 2.2.8.1). En este caso, las células con confluencia del 90-100% se sembraron en placas de 96 pocillos 24 h antes del tratamiento. Estos consistieron en diferentes concentraciones de cada tipo de nanofibra y 5-ALA previamente disueltos en tampón de fosfato 1 mM (pH 7) durante 30 min. Las disoluciones de nanofibras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min y temperatura ambiente para separar el sedimento centrifugado del sobrenadante, siendo este último el utilizado en los tratamientos. El volumen total final por pocillo fue 100  $\mu$ L, de los cuales 90 corresponden a medio de cultivo de las células. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran como media en porcentaje (%) y su error como desviación estándar (sd) de tres experimentos diferentes.

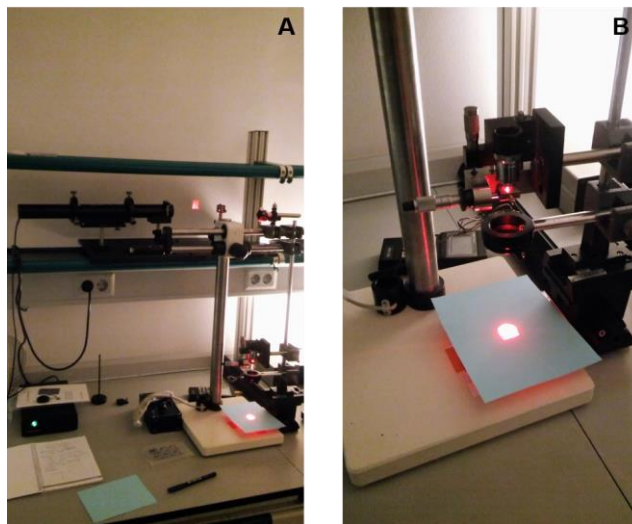
### 2.2.11. Ensayos de acumulación de PpIX

Con el fin de comprobar la funcionalidad del 5-ALA cargado en los diferentes tipos de nanofibras, se midió la cantidad de PpIX convertida a partir de ese 5-ALA internalizado en células como se describió previamente por Jin Ju Yoo y col.<sup>153</sup>. Para ello, se trataron células con confluencia del 90-100%, que se sembraron en placas de 96 pocillos 24 h antes, con diferentes concentraciones de cada tipo de nanofibra y 5-ALA previamente disueltos en tampón de fosfato 1 mM (pH 7) tal y como se describe en el apartado anterior. A continuación, se lisaron las células con tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,1% SDS) y se midió la PpIX acumulada en las células con un lector de placas multimodulación de imágenes de células Cytation 3 (BioTek Instruments Inc., EE.UU.) a 485 nm (excitación) y longitudes de onda de 635 nm (emisión). Se realizó una curva estándar correlacionando unidades de emisión de PpIX con 5-ALA añadidas (concentraciones que varían de 0-200 µg/L) para inferir la cantidad de 5-ALA funcional en las muestras. Se encontró una correlación lineal entre 25 y 100 µg/mL con valores de coeficiente de regresión ( $R^2$ ) superiores a 0,96. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan en µg/mL y se muestran como medias en porcentaje (%) y su error como desviación estándar (sd) a partir de tres experimentos diferentes

### 2.2.12. Actividad fototerápica

Con el fin de evaluar la actividad fotodinámica del 5-ALA cargado en nanofibras experimentales, se siguió el mismo procedimiento que se describe anteriormente para los ensayos de acumulación de PpIX. Sin embargo, en lugar de lisar las células después del tratamiento, se irradiaron con diferentes potencias ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) a una longitud de onda de 635 y 405 nm usando unas lámparas de irradiación. A continuación, el medio de cultivo se cambió y se midió la viabilidad celular mediante el ensayo MTT como se describió anteriormente.

En este sentido, en colaboración con el departamento de óptica de la Universidad Miguel Hernández de Elche dirigido por el Dr. Ignacio Moreno, se han desarrollado los prototipos del sistema emisor de luz (con diferentes fuentes lumínicas tales como láseres y sistemas led) que permitiría dicha comprobación a una longitud de onda e intensidad precisa (Figura 15).



**Figura 15. Imágenes descriptivas del sistema de proyección lumínica diseñado para la realización de los experimentos de irradiación de células tratadas en el contexto de la terapia fotodinámica. A) Imagen general del dispositivo emisor de luz (en este caso láser). B) Imagen concreta del foco de luz dispuesto para una irradiación vertical y desde arriba de la muestra experimental.**



## **Resultados y discusión**



### 3. Resultados y discusión

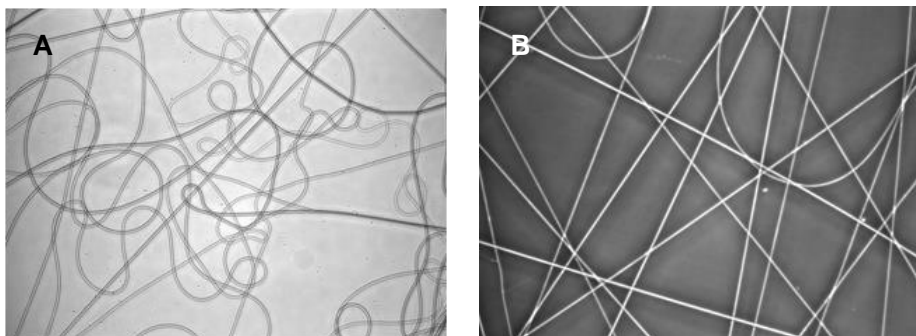
La preparación y caracterización previa de las nanofibras compuestas por PMVEMA-Ac y PMVEMA-ES, se realizó modificando las condiciones experimentales del *electrospinning* (sección 1.3 de este capítulo) y fueron realizadas en trabajos dirigidos en nuestro grupo<sup>216</sup>.

La validación y optimización del proceso de nanofibras fue, tanto en grosor como homogeneidad, analizado por microscopía óptica de fluorescencia. Aquellas nanofibras que presentaban los polielectrolitos conjugados PFP<sup>+</sup> (azul) y PFNT<sup>+</sup> (rojo) eran irradiadas para contrastar la calidad y homogeneidad de las fibras buscando valores inferiores a la micra.

#### 3.1. Microscopía óptica de fluorescencia

Se prepararon nanofibras de PMVEMA-Ac a partir de una disolución acuosa de PMVEMA-Ac 20% p/p y se analizaron mediante microscopía óptica. Se observó que presentaban una morfología adecuada: nanofibras continuas, de tamaño uniforme, sin defectos e inferiores a la micra (figura16).

Empleando las mismas condiciones de *electrospinning* se elaboraron nanofibras a partir de una disolución de PMVEMA-ES 20% p/p en etanol, y se obtuvo una disolución de menor viscosidad que la de PMVEMA-Ac 20% p/p.

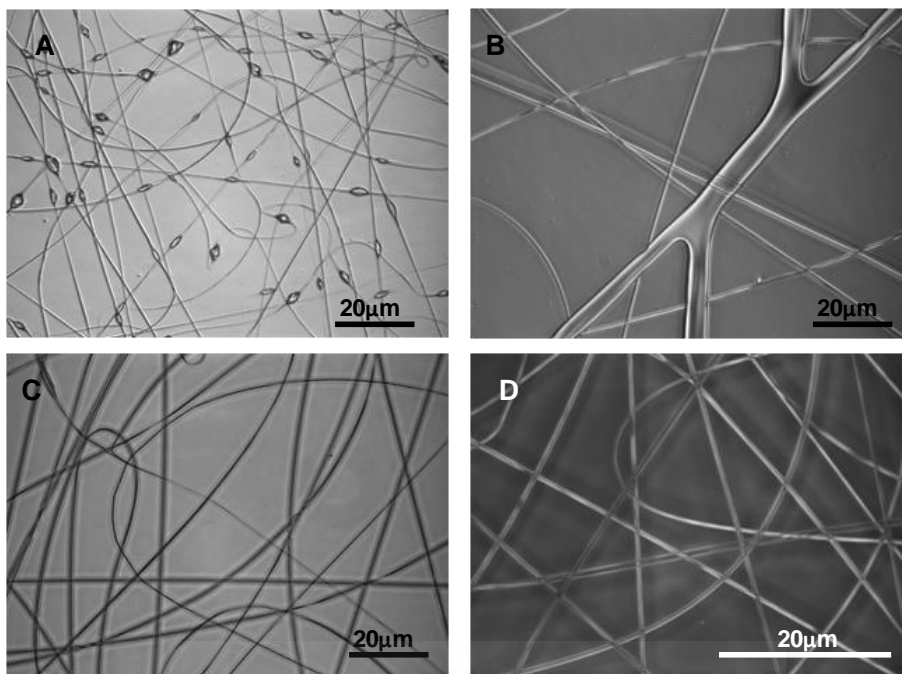


**Figura 16: Nanofibras de PMVEMA-Ac:** imágenes de microscopía óptica a diferentes aumentos. A) Imagen a 400x y B) imagen a 600 x.

El resultado obtenido a partir de la disolución de PMVEMA-ES 20% p/p fueron nanofibras con imperfecciones con aspecto de “perlas en cadena” (figura 17A). Por tanto, se evaluó en rango de concentraciones entre 20-30% p/p de PMVEMA-ES para mejorar las nanofibras. En primer lugar, se incrementó la concentración de la disolución polimérica a un 30% p/p, lo que originó la formación de fibras de distintos grosores, algunas de ellas fuera de la escala nanométrica (figura 17B).

Finalmente, a una concentración intermedia de PMVEMA-ES 25% p/p en etanol, se demostraron resultados óptimos, obteniendo nanofibras sin irregularidades ni imperfecciones (figura 17 C y D), al igual que en el caso de las nanofibras de PMVEMA-Ac preparadas anteriormente.





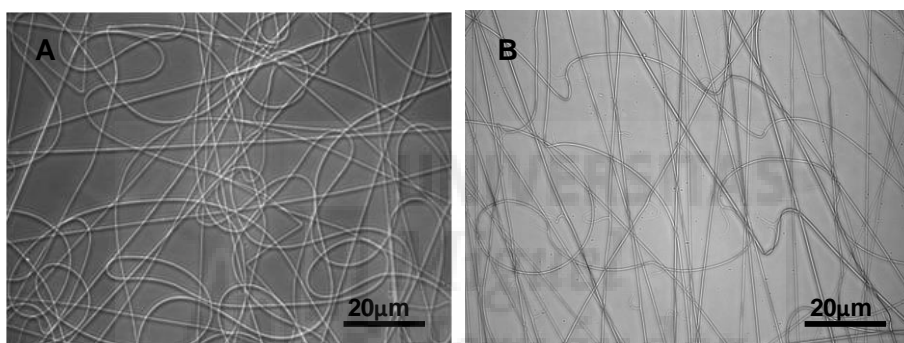
**Figura 17:** Nanofibras de PMVEMA-ES a partir de disoluciones con diferente concentración. A: PMVEMA-ES 20% p/p. B: PMVEMA-ES 30% p/p. C y D: PMVEMA-ES 25% p/p. D) Ampliación de C.

Por tanto, a una misma concentración de polímero, 20% p/p, la viscosidad del PMVEMA-ES en etanol es menor que la del PMVEMA-Ac en agua, y para obtener nanofibras sin defectos en las mismas condiciones de *electrospinning* se requirió aumentar la concentración del PMVEMA-ES hasta el 25% p/p.

El siguiente paso, fue el análisis de nanofibras al adicionar fármaco. La relación de fármaco/polímero (16,6% p/p) se seleccionó basado en la terapia convencional para el ácido 5-aminolevulínico: Levulan® solución 20% (comercializado en Estados Unidos) y Ameluz® gel 7,8% (comercializado en Europa). Se comprobó la capacidad de carga de las nanofibras incorporando el fármaco a una concentración

alta/media entre ambos preparados de referencia, 16,6% p/p. No obstante, la dosificación final depende no sólo de la concentración del fármaco en el vehículo, sino de la cantidad total aplicada sobre la piel en función de la extensión de las lesiones.

La adición del 16,6% p/p de 5-ALA a una disolución homogénea de PMVEMA-Ac originó unas nanofibras con morfología correcta a la vez que se incluía una elevada carga de fármaco (figura 18A).

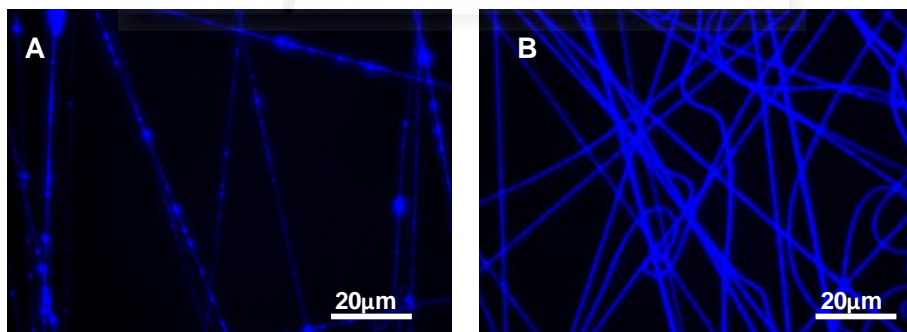


**Figura 18:** Nanofibras poliméricas con 5-ALA 16,6% p/p respecto del polímero sólido. A: PMVEMA-Ac. B: PMVEMA-ES.

Del mismo modo, 5-ALA previamente disuelto en agua se añadió a una disolución de PMVEMA-ES 25% p/p en etanol. En este caso las nanofibras mostraron leves imperfecciones (figura 18B), no presentes en las nanofibras anteriores de PMVEMA-Ac. Esto se pudo deber a que 5-ALA se distribuya más irregularmente en las nanofibras de PMVEMA-ES que en las de PMVEMA-Ac, lo que se podría corregir mejorando la técnica de incorporación del fármaco a la disolución de PMVEMA-ES en etanol. Por ejemplo, disolviendo 5-ALA en mezcla

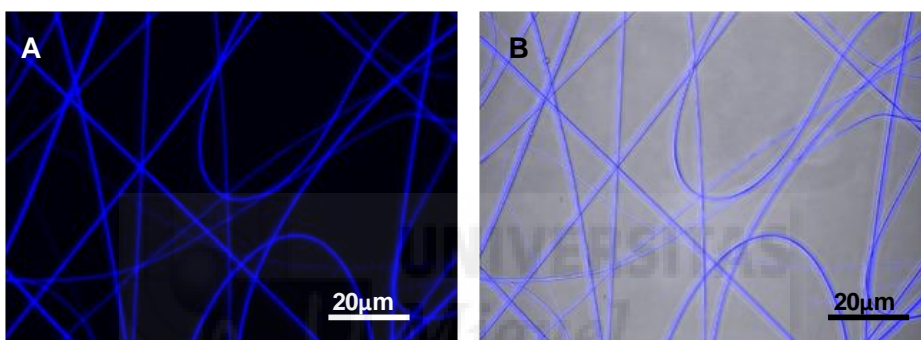
etanol/agua para favorecer su solubilidad en la disolución matriz polimérica.

La adición del polielectrolito conjugado fluorescente PFP<sup>+</sup> a la disolución de PMVEMA-Ac 20% p/p no supuso ningún cambio aparente en la morfología de las nanofibras. Sin embargo, mediante microscopía de fluorescencia se pudo observar que las nanofibras presentaban una fluorescencia heterogénea (figura 19A) es decir, el PFP<sup>+</sup> no se había distribuido uniformemente en la disolución polimérica, lo que se evidenciaba por la presencia de agregados insolubles (artefactos fluorescentes). Para su correcta incorporación se requirió la disolución previa del PFP<sup>+</sup> en DMSO y agua en relación 7:93 (v/v), así como agitación magnética constante de la disolución de PMVEMA-Ac durante al menos 20 horas. Este método permite obtener nanofibras con fluorescencia mucho más homogénea, aunque persisten algunas pequeñas irregularidades (figura 19B) que podrían minimizarse optimizando aún más dos parámetros anteriores: tiempo de agitación y la disolución previa.



**Figura 19:** Nanofibras de PMVEMA-Ac con PFP<sup>+</sup> 0,75% p/p. A) Agitación del polielectrolito durante 1h (mal distribuido). B) Agitación durante 20h.

Por otra parte, la adición del PFP<sup>+</sup>, previa disolución en DMSO y agua a la disolución de PMVEMA-ES 25% p/p en etanol resultó más fácil y homogénea que en el caso de la disolución de PMVEMA-Ac en agua debido a una mayor solubilidad del polielectrolito conjugado en etanol que en agua. Esta solubilidad se pone de manifiesto ya que las nanofibras obtenidas presentaban una fluorescencia más homogénea y sin irregularidades (figura 20).

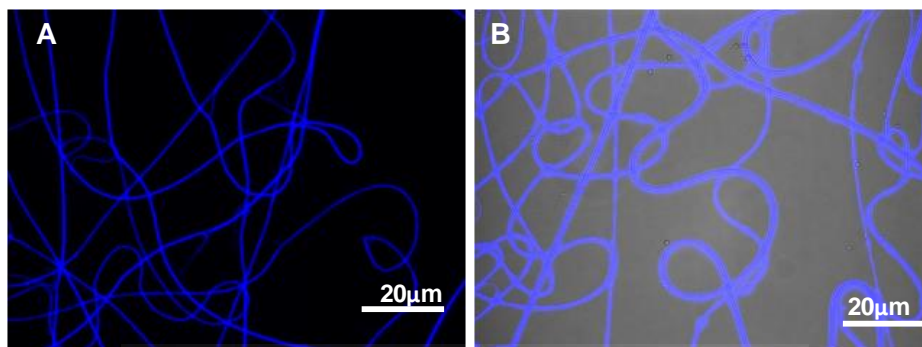


**Figura 20. Nanofibras de PVMVEMA-ES con PFP<sup>+</sup> 0,75% p/p. A:** Microscopía óptica de fluorescencia. **B:** Superposición de microscopía óptica de contraste de fases y fluorescencia.

En la figura 20B, se aprecia como las fibras obtenidas por contraste de fases presentan la luminiscencia en el interior de la muestra como ya se había confirmado previamente con nanofibras obtenidas en mezclas de acetato de celulosa<sup>222</sup> y de polimetilmetacrilato<sup>223</sup>.

Para adicionar PFP<sup>+</sup> y 5-ALA a una misma disolución polimérica de PMVEMA-ES 25% se realizó de la misma manera que en las disoluciones precedentes, una vez homogeneizado el polielectrolito conjugado durante el tiempo necesario (24 horas), se

añadió a la disolución el 5-ALA disuelto en agua. De este modo se obtuvieron nanofibras poliméricas con un 0,75% p/p de PFP<sup>+</sup> y un 16,6% p/p de 5-ALA, tanto de PMVEMA-Ac (figura 21B) como de PMVEMA-ES (figura 21A).



**Figura 21: Nanofibras de los derivados de PMVEMA con PFP<sup>+</sup> 0,75% p/p y ALA 16,6% p/p.** A) Imagen de fluorescencia de las nanofibras realizadas con PMVEMA-ES. B) Imagen de fluorescencia sobre contraste de fase de las nanofibras realizadas PMVEMA-Ac.

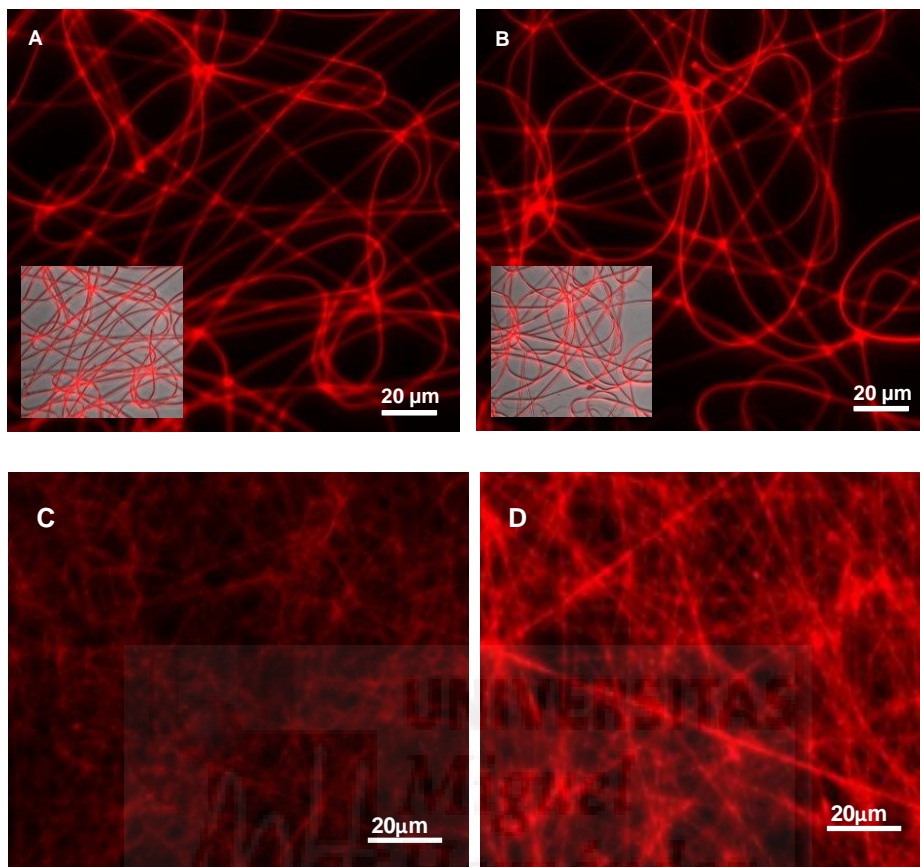
No hay cambios morfológicos ni defectos entre los distintos tipos de nanofibras fabricadas; *a priori* no se observan defectos por la integración del fármaco y/o polielectrolito a las nanofibras.

La morfología de las nanofibras con PFP<sup>+</sup> y 5-ALA fue idéntica a las que contenían únicamente 5-ALA. Del mismo modo, la fluorescencia de las nanofibras con 5-ALA es equiparable a las nanofibras sin 5-ALA. Por tanto, la presencia del PFP<sup>+</sup> no afectó a la incorporación de 5-ALA y viceversa. En cambio, el grado de homogeneidad en la inclusión de 5-ALA y PFP<sup>+</sup> sí dependió de la matriz polimérica empleada, PMVEMA-Ac o PMVEMA-ES.

En el caso del polielectrolito conjugado PFNT<sup>+</sup> con las disoluciones de PMVEMA-Ac 20% p/p y PMVEMA-ES 25% p/p en etanol resultó más complicada que con PFP<sup>+</sup>. Aquí, el protocolo de fabricación de las nanofibras con el polielectrolito emisor rojo fue el mismo que para el polielectrolito conjugado azul salvo que se tuvo que dejar la mezcla en agitación durante 48h para obtener fibras homogéneas (figura 22), tanto para las que incorporaban fármaco como para las que no lo llevaban.

La morfología de las nanofibras con PFNT<sup>+</sup> y 5-ALA fue idéntica a las que contenían únicamente 5-ALA. Del mismo modo, la fluorescencia de las nanofibras con 5-ALA es equiparable a las nanofibras sin 5-ALA. Por tanto, la presencia del PFNT<sup>+</sup> no afectó a la incorporación del 5-ALA y viceversa.

Se ha podido comprobar que una correcta homogenización de los componentes de la disolución polimérica es muy importante para obtener nanofibras de calidad. Recordemos además que un factor decisivo en la fabricación de estas nanofibras la disolución polimérica debe alcanzar una adecuada viscosidad que obviamente dificulta esta homogenización.



**Figura 22: Microscopías ópticas de fluorescencia de nanofibras.**

A) PMVEMA-ES con PFNT<sup>+</sup> 0,75% p/p. B) PMVEMA-ES con PFNT<sup>+</sup> 0,75% y 5-ALA 16,6% p/p, superposición de microscopía óptica de contraste de fases y fluorescencia. C) PMVEMA-Ac con PFNT<sup>+</sup> 0,75% p/p. D) PMVEMA-Ac con PFNT<sup>+</sup> 0,75% y 5-ALA 16,6% p/p.

En resumen, durante la incorporación de 5-ALA y de PFP<sup>+</sup> entre las dos matrices poliméricas empleadas, las nanofibras de PMVEMA-Ac y de PMVEMA-ES, se observaron diferencias. En el caso de la disolución acuosa de PMVEMA-Ac, está más favorecida la adición del 5-ALA (hidrosoluble), obteniéndose nanofibras sin alteraciones morfológicas. En cambio, el polielectrolito conjugado

PPF<sup>+</sup> se incluye con más facilidad al PMVEMA-ES (en etanol) y genera nanofibras con una fluorescencia más uniforme.

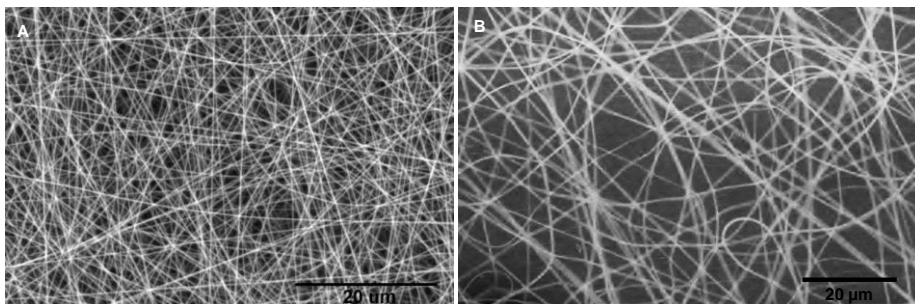
Estos resultados coinciden con la baja solubilidad de los polímeros señalizadores en agua y su mejora en disolventes orgánicos, como es en este caso el etanol en las disoluciones de PMVEMA-ES. Caso contrario al del fármaco utilizado que es hidrosoluble y, por tanto, se encuentra en mejores condiciones con el derivado ácido del PMVEMA.

Por último, la presencia de un compuesto iónico como los polielectrolitos conjugados va a mejorar el procesado de la electrohilatura y, por tanto, las fibras con estos componentes presentan menores problemas de fabricación.

### **3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las fibras elaboradas fueron estudiadas en detalle con SEM. Esta técnica nos permite hacer un barrido sobre la muestra donde podemos analizar la homogeneidad de las fibras y donde podemos obtener un plano más representativo que no se alcanza con la resolución del microscopio óptico. Aun así, debido al pequeño tamaño de las fibras no podemos realizar un análisis cuantitativo mediante esta técnica, pero si confirmar que se encuentran por debajo del orden de la micra y que su morfología está extendida en toda la muestra, lo que nos indica la regularidad del velo de nanofibras (figura 23).



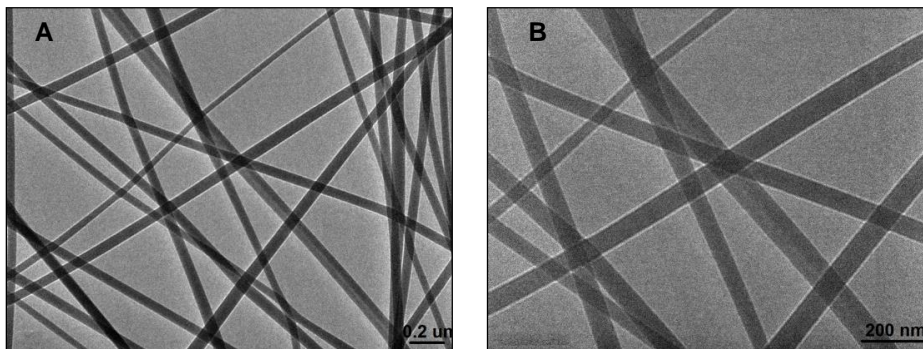


**Figura 23: Imágenes del SEM:** A) Nanofibras de PMVEMA-Ac 20% p/p y B) PMVEMA-ES (3).

En las imágenes se puede observar cómo se han realizado nanofibras con PMVEMA-Ac de dimensiones inferiores a 500 nm y homogéneas, con un nivel de resolución superior a un microscopio óptico. Por su parte, las fibras realizadas con PMVEMA-ES también presentan un aspecto homogéneo, pero con un grosor ligeramente superior.

### 3.3. Microscopía óptica de transmisión (TEM)

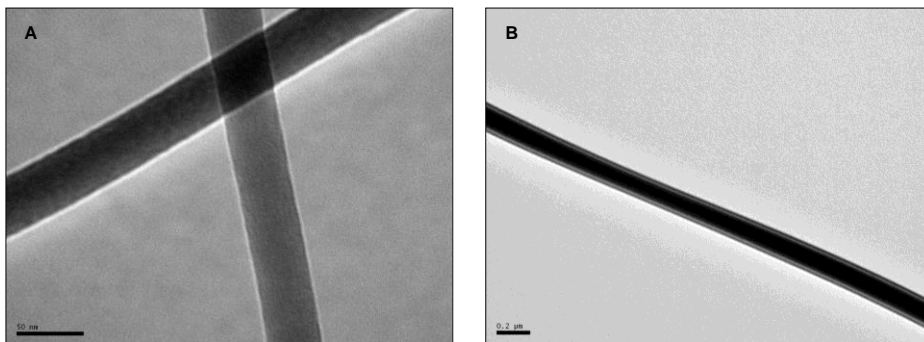
Los estudios realizados por microscopía electrónica de transmisión, permiten una mayor resolución de las muestras con mayores aumentos, por tanto, se empleó para un estudio de las fibras con el que se estimaron los diámetros de las fibras (figura 24).



**Figura 24:** Imágenes del TEM de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% p/p. A) sin 5-ALA (16,6%). B) con 5-ALA (16,6% p/p).

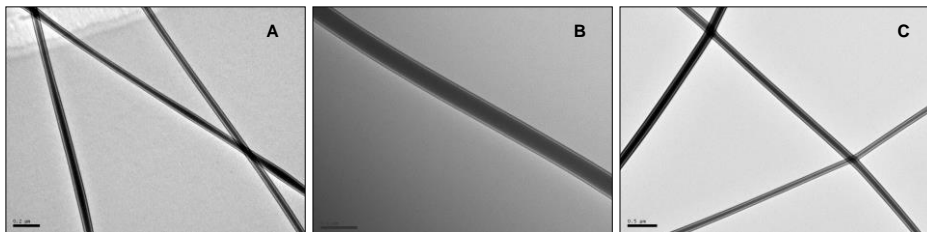
Estas imágenes de fibras de matriz PMVEMA-Ac obtenidas mediante la técnica de TEM se utilizaron con fines cuantitativos, para realizar el análisis de las distribuciones de diámetros de las fibras del PMVEMA-Ac y poder tener una idea del tamaño real. El diámetro medio de las fibras es una medida que informa sobre la homogeneidad de estas nanoestructuras. En la figura 25 se muestran las imágenes obtenidas con el TEM de las fibras de PMVEMA-Ac con y sin 5-ALA. En ambos casos, se analizaron los diámetros de las fibras en diferentes fotografías y su distribución de diámetros resultó ser monomodal, indicativo que las fibras obtenidas fueron electrohiladas bajo condiciones operacionales óptimas. El diámetro promedio de las fibras PMVEMA-Ac sin 5-ALA están en torno a  $55\pm 5$  nm mientras con 5-ALA entorno  $85\pm 10$  nm, por lo que se ha cumplido el objetivo de obtener nanofibras regulares.

Para las fibras realizadas con PMVEMA-ES, a la vista de las imágenes tanto de SEM como algunas de TEM (figura 25), se apreció la uniformidad y regularidad al igual que las nanofibras de PMVEMA-Ac.



**Figura 25: Imágenes del TEM de nanofibras de PMVEMA-ES 25% p/p.** A: Sin 5-ALA, barra de escala a 50 nm. B) Con 16,6% p/p de 5-ALA, barra de escala a 200 nm.

Entre las nanofibras de PMVEMA-ES con y sin 5-ALA, sí hay una ligera diferencia de tamaños, apreciándose un aumento de más del doble de diámetro al incorporar el fármaco en el interior, ya que no se observan imperfecciones en la superficie. En este caso, las nanofibras realizadas únicamente con polímero transportador PMVEMA-ES presentan un tamaño alrededor de 60 nm parecido a las realizadas con el PMVEMA-Ac, mientras que con 5-ALA, el diámetro es de 125 nm. Este dato indica claramente que la adición del fármaco da lugar a un cambio estructural en la fabricación de la nanofibra de PMVEMA-ES.

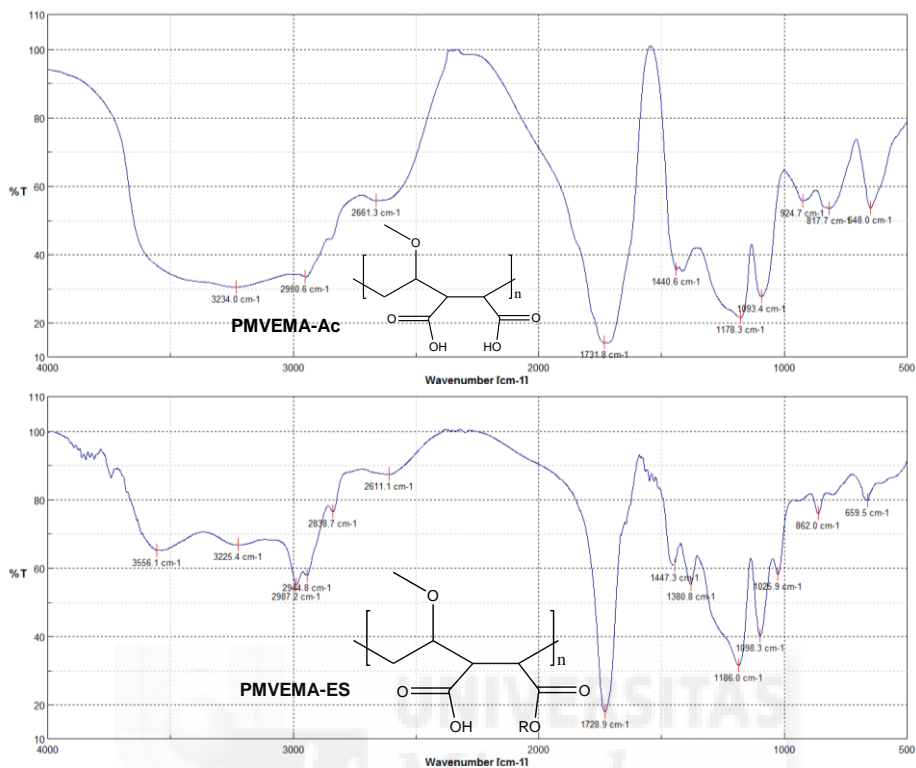


**Figura 26: Imágenes del TEM de nanofibras.** A: PMVEMA-Ac 20% + PFP<sup>+</sup> 0,75% (barra de escala a 200 nm). B) PMVEMA-ES 25% + PFP<sup>+</sup> 0,75% (barra de escala a 200 nm). C) PMVEMA-ES 25% + PFNT<sup>+</sup> 0,75% (barra de escala a 500 nm).

De nuevo, la adición de polielectrolito conjugado tanto de PFP<sup>+</sup> como PFNT<sup>+</sup> en las nanofibras de PMEMA-Ac, no varía el diámetro de estas nanofibras, sin embargo, la adición tanto de polielectrolitos a las nanofibras de PMVEMA-ES si aumenta el diámetro de las mismas, sin exceder en ningún caso observado los valores de 150 nm.

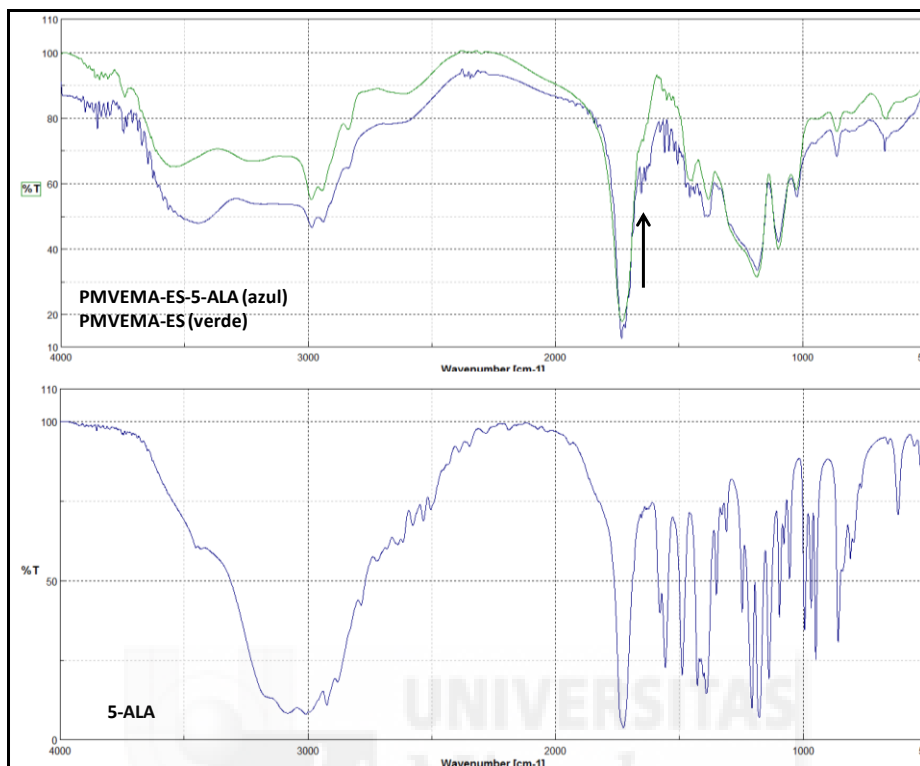
### 3.4. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Con el fin de analizar la estructura del polímero transportador después del proceso de electrohilado, se realizó un estudio funcional mediante la técnica de espectroscopia infrarroja. Se comprobó que ambos polímeros derivados del PMVEMA mantenían su estructura funcional de ácido y éster.



**Figura 27: Espectros infrarrojos.** Arriba) Muestras PMVEMA-Ac en pastilla de KBr. Abajo) Nanofibras de PMVEMA-ES.

El espectro de las fibras de PMVEMA-ES muestra las bandas vibracionales de tensión a  $1729$  y  $2987$   $\text{cm}^{-1}$  pertenecientes al grupo carbonilo y al metilo, respectivamente. En el espectro de infrarrojo del PMVEMA-Ac se observa una gran banda ancha entre  $3500$  y  $2900$   $\text{cm}^{-1}$ , característica de las bandas de vibración de tensión de los grupos  $-\text{OH}$  en los ácidos carboxílicos, menos acusada en el espectro del monoéster derivado, y totalmente ausente en el espectro IR del anhídrido de partida de PMVEMA (Sigma-Aldrich)<sup>224</sup>.



**Figura 28:** Superposición de los espectros infrarrojos de las fibras de PMVEMA-ES 25% (arriba) sin 5-ALA (verde) y con 5-ALA (azul) y espectro infrarrojo del 5-ALA en pastilla de KBr (abajo).

Precisamente en la zona de vibración de tensión del carbonilo que es entre  $1900 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  el espectro de PMVEMA anhídrido es muy diferente por mostrar dos bandas de fuerte absorción a  $1860$  y  $1790 \text{ cm}^{-1}$ , asociadas a un grupo anhídrido cíclico (maleico), mientras que, en el espectro de las fibras de sus derivados, estas no aparecen y se observa una única banda de ácido carboxílico a  $1720-1730 \text{ cm}^{-1}$ , asignada al ácido maleico<sup>225</sup>. Por último, la forma de las bandas por debajo de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  (huella dactilar) presentan alguna diferencia apreciable que sirve para diferenciar entre si los derivados de PMVEMA.

A estas nanofibras, tanto de PMVEMA-Ac como de PMVEMA-ES, la adición de 5-ALA al 16,6% p/p, no modifica el espectro de IR, apenas hay un ligero cambio de espectro que sufre el PMVEMA-ES (marcado con una flecha). El espectro de infrarrojo del PMVEMA-Ac no se presenta debido a presentar una banda ancha a  $1730\text{ cm}^{-1}$  que prácticamente hace desaparecer la señal característica de 5-ALA que nos pudiese indicar esta incorporación significativa en las nanofibras. Para ello, el contenido de 5-ALA se obtuvo por extracción acuosa de las fibras y analizado mediante cromatografía líquida de alta resolución.

### 3.5. Espectroscopia de fluorescencia en estado sólido

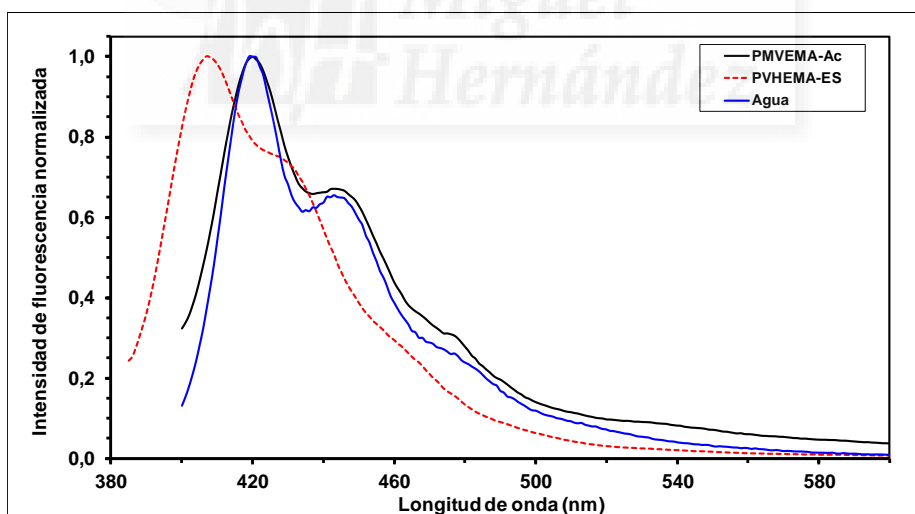
Las propiedades ópticas de las nanofibras de PMVEMA-Ac y PMVEMA-ES con PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> se analizaron mediante espectroscopia de fluorescencia en estado sólido (ver apartado de métodos 2.2.6). En primer lugar, se confirmó que los espectros de fluorescencia registrados se debieron a la presencia de los polímeros conjugados fluorescentes PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>, mientras que no había emisión en comparación por parte de las nanofibras poliméricas que no contenían polielectrolitos fluorescentes.

Antecedentes previos a la realización y análisis de estas nanofibras con derivados del copolímero PMVEMA y polielectrolitos conjugados de fluoreno, describieron los estados de fluorescencia de las nanofibras realizadas con acetato de celulosa<sup>222</sup> y poli(metilmetacrilato)<sup>223</sup>. Algunas de estas nanofibras fluorescentes en dichas matrices poliméricas mostraron que los espectros de fluorescencia de los polielectrolitos presentaban bandas menos definidas y emitían unas bandas nuevas desplazadas hacia el rojo que apuntaban a altos grados de agregación o aglomeraciones del

polielectrolito fluorescente en el material.

Analizando las dimensiones de las nanofibras de acetato de celulosa realizadas en nuestro laboratorio y descritas en el artículo de Vázquez Guilló y col.<sup>222</sup> se observaron tamaños de nanofibras alrededor de 100-150 nm en ausencia de polielectrolito emisor azul y este tamaño se duplicó al introducir un 0,5% p/p de PFP<sup>+</sup> con respecto al acetato de celulosa. Otros autores como Kuo y col.<sup>223</sup>, describieron tamaños entre 250 y 750 nm para fibras de poli(metilmetacrilato) mezclados con tres polifluorenos fluorescentes.

Teniendo en cuenta estos precedentes, en primer lugar, se obtuvieron los espectros de fluorescencia en estado sólido de las nanofibras que contenían PFP<sup>+</sup> tanto de PMVEMA-Ac como de PMVEMA-ES (figura 29).



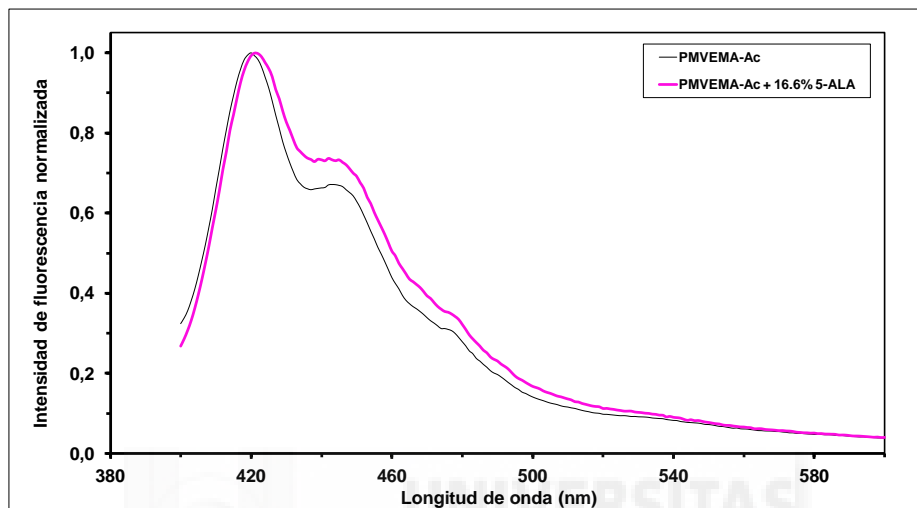
**Figura 29:** Espectros normalizados de fluorescencia del PFP<sup>+</sup> en nanofibras de PMVEMA-Ac (línea negra), en nanofibras de PMVEMA-ES (línea discontinua roja) y en disolución acuosa (línea azul).



Las nanofibras de PMVEMA-Ac presentaron una banda de emisión máxima a 421 nm y otra banda neta a 443 nm. Por otro lado, las nanofibras de PMVEMA-ES presentaron una banda de emisión máxima a 407 nm y un hombro entorno a 430 nm. En esta figura, se aprecia que al incorporar el PFP<sup>+</sup> en nanofibras de PMVEMA-Ac el espectro en estado sólido se asemejó al del PFP<sup>+</sup> en disolución acuosa donde tiende a formar agregados<sup>51-53,55-57,226</sup> y esto se pone de relieve en la banda alrededor 480 nm como un pequeño hombro que sobresale. En cambio, en las nanofibras de PMVEMA-ES, el espectro de fluorescencia apareció desplazado hacia longitudes de onda menores (efecto hipsocrómico), como sucede cuando el PFP<sup>+</sup> se incorpora en estructuras ordenadas como películas de sílice mesoporosa<sup>62</sup>. Esto puede deberse a una conformación más extendida del PFP<sup>+</sup> en las nanofibras de PMVEMA-ES con respecto al PMVEMA-Ac, lo que coincide con las observaciones realizadas mediante microscopía de fluorescencia, donde se apreció que el PFP<sup>+</sup> se incorporaba más fácilmente y presentaba mayor homogeneidad en las nanofibras de PMVEMA-ES (figura 20). Por lo tanto, el espectro de emisión del PFP<sup>+</sup> varía en función de la matriz polimérica en la que se encuentre. Atendiendo al carácter hidrofílico de cada uno de ellos se puede ver que el PFP<sup>+</sup> en las nanofibras poliméricas adopta una disposición conformacional diferente.

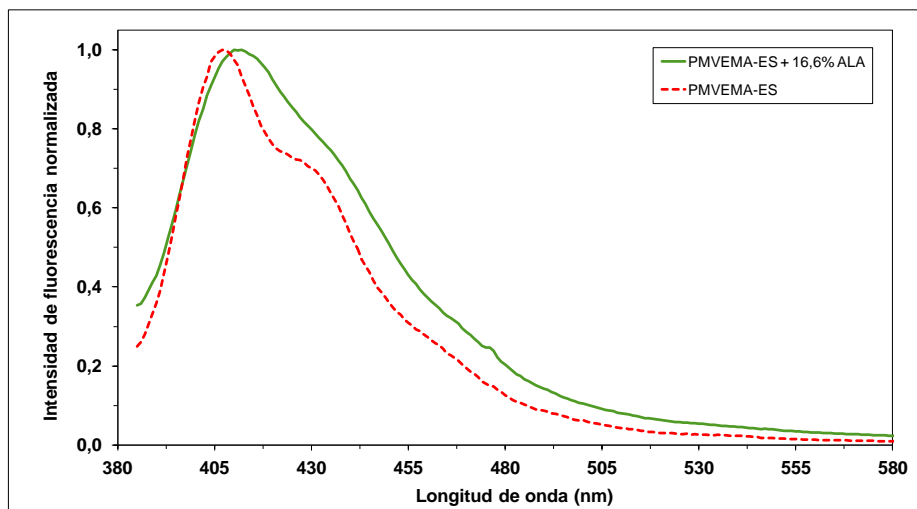
Por otro lado, la adición del ácido 5-aminolevulínico a las nanofibras de PMVEMA-Ac (figura 30) no perturbó significativamente las propiedades ópticas del fluoróforo azul. Se observó una leve diferencia entre la resolución de la banda entorno a 443 nm, posiblemente debida a cambios en la homogeneidad de las nanofibras poliméricas al añadir 5-ALA. Como se ha venido observando en experiencias previas en el laboratorio, el diámetro de las fibras con 5-ALA es mayor<sup>216</sup> y es habitual que se alteren ligeramente las

propiedades de las nanofibras cargadas con fármacos, lo que evidencia que el fármaco se ha incorporado.



**Figura 30.** Espectros normalizados de fluorescencia del PFP<sup>+</sup> en nanofibras de PMVEMA-Ac (línea negra) y con ácido 5-aminolevulínico 16,6% p/p (línea rosa).

Sin embargo, en las nanofibras de PMVEMA-ES, la adición del 5-ALA se produce una modificación significativa en las propiedades ópticas del fluoróforo, desplazándose al rojo 6 nm. Este cambio puede ser debido a las interacciones por fuerzas de Van de Waals (puentes de hidrógeno) entre moléculas. Se aprecia como la banda principal se ensancha y se pierde la resolución espectral del hombro observada en el espectro de nanofibras de PMAVMA-Ac que se puede atribuir a la adición del fármaco.

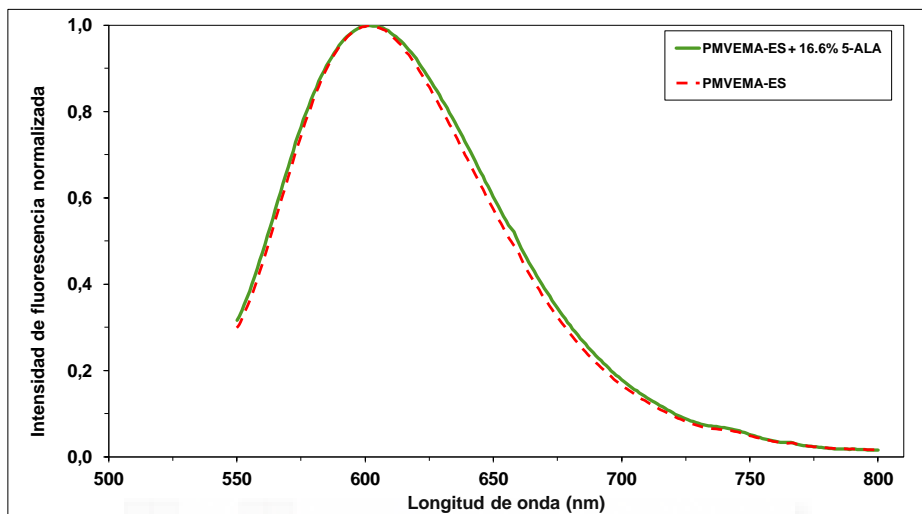


**Figura 31:** Espectros normalizados de fluorescencia del PFP<sup>+</sup> en nanofibras de PMVEMA-ES (línea roja discontinua) y con ácido 5-aminolevulínico 16,6% p/p (línea verde).

Debido a que la incorporación del fluoróforo PFP<sup>+</sup> es más sensible al entorno que PFNT<sup>+</sup> se decidió no realizar el estudio con PMVEMA-Ac donde ya se mostraba que no hay diferencias significativas al adicionar el polielectrolito emisor azul (figura 29). Por tanto, la incorporación del PFNT<sup>+</sup>, se ha focalizado en las nanofibras de PMVEMA-ES.

Paralelamente, se estudió las nanofibras de la disolución de PMVEMA-ES con PFNT<sup>+</sup> sin fármaco y con 5-ALA (figura 32). La incorporación del 5-ALA no modifica ni altera la intensidad de fluorescencia por parte del PFNT<sup>+</sup>, con la misma banda centrada a 601 nm. Por tanto, ambos espectros, las fibras de PMVEMA-ES con PFNT<sup>+</sup> y las mismas con 5-ALA, no altera las propiedades ópticas del fluoróforo. En este punto, a pesar de no mostrar diferencias espectrales, en estado sólido se produce una emisión más acusada e

importante que en disolución acuosa.



**Figura 32:** Espectros normalizados de fluorescencia del PFNT<sup>+</sup> en nanofibras de PMVEMA-ES (línea roja discontinua) y con ácido 5-aminolevulínico 16,6% p/p (línea verde).

Por último, con el fin de comprobar la presencia de 5-ALA en la nanofibra, se pesó 1-2 mg de la nanofibra que contenía el 16,6% de 5-ALA y se disolvió en agua. El análisis cromatográfico de las muestras fluorescentes confirmó que la inclusión del fármaco era cuantitativa ( $100\pm 2\%$ ).

### 3.6. Estudios *in vitro* de permeabilidad en piel

En los ensayos de liberación *in vitro* con celdas de Franz, detallados en la sección 2.2.7 de este capítulo, se comparó la cinética de liberación del ácido 5-aminolevulínico en las nanofibras con respecto a las disoluciones poliméricas de PMVEMA-Ac y PMVEMA-ES. Además, se estudiaron las diferencias entre las matrices poliméricas de ambos polímeros comerciales, junto con el efecto de PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup> en las nanofibras fluorescentes de PVMEMA-ES.

Se realizaron cuatro ensayos de liberación de acuerdo con la metodología anteriormente descrita. Los estudios se diferenciaron en las muestras empleadas. En los primeros ensayos, se evaluaron las disoluciones poliméricas de PMVEMA-Ac con 5-ALA y las nanofibras con 5-ALA elaboradas a partir de dichas disoluciones, posteriormente, en las siguientes pruebas se utilizaron muestras de nanofibras poliméricas de PMVEMA-ES que contenían el polielectrolito PFP<sup>+</sup> o PFNT<sup>+</sup>.

Previamente a realizar los ensayos con celdas de Franz se confirmó que las nanofibras y las disoluciones contenían idéntica cantidad de 5-ALA, como ya se ha comentado en la sección precedente. Para ello, se realizaron por un lado diluciones de las disoluciones poliméricas originales debido a su elevada viscosidad y concentración de 5-ALA y por otro, se trataron las nanofibras mediante agitación en *vórtex* en disolución acuosa para extraer el 5-ALA. En ambos casos, la determinación mediante ELSD-HPLC confirmó la presencia de las cantidades establecidas de 5-ALA según la metodología descrita (sección 2.2.7). Los resultados obtenidos de una concentración en fibras al 16,6% de 5-ALA de 1,07 y 1,02 mg/mL en disolución acuosa resultaron ser del 99% y 102%, respectivamente.

A continuación, se estudió la cinética de liberación del 5-ALA en las matrices poliméricas objeto de estudio, así como de sus formulaciones. La cantidad acumulativa de 5-ALA liberada en función del tiempo, se calculó mediante los datos de las concentraciones de 5-ALA en los compartimentos receptores obtenidos a través del HPLC (sección 2.2.7). Los resultados, se representaron como el porcentaje de 5-ALA liberado frente al tiempo, tomando como referencia del 100% liberado, la cantidad teórica de 5-ALA inicialmente adicionada en el compartimento donador y los datos experimentales corregidos por el efecto de toma de muestra. Todos los ensayos se realizaron por triplicado obteniendo así sus medias y unas desviaciones no superiores al 15% de error relativo.

En el primer ensayo se analizaron y compararon los resultados de las disoluciones de PMVEMA-Ac y las nanofibras de PMVEMA-Ac resultantes de la anterior disolución (figura 33).

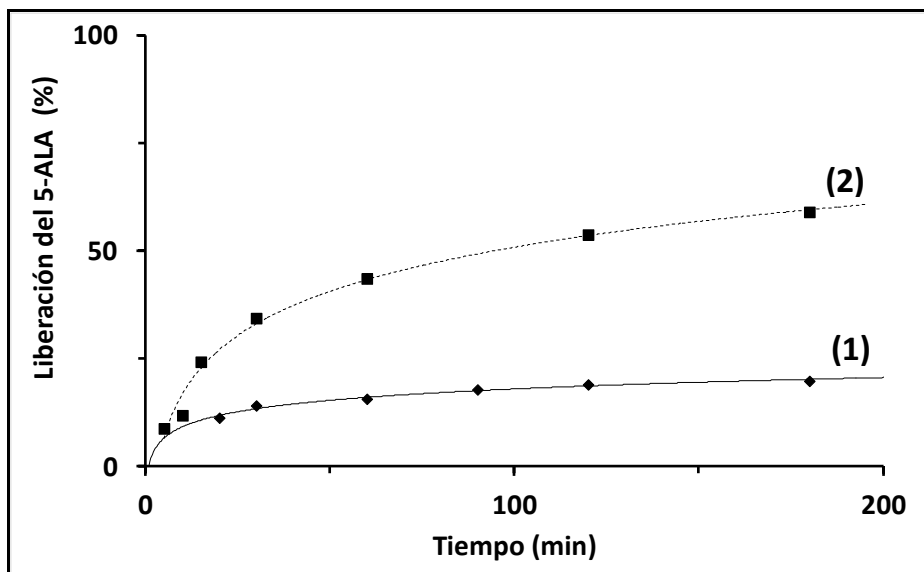


Figura 33: Cinética de liberación del 5-ALA en diferentes formulaciones poliméricas. (1) Disolución PMVEMA-Ac 20% p/p. (2) Nanofibras de PMVEMA-Ac 20% p/p.

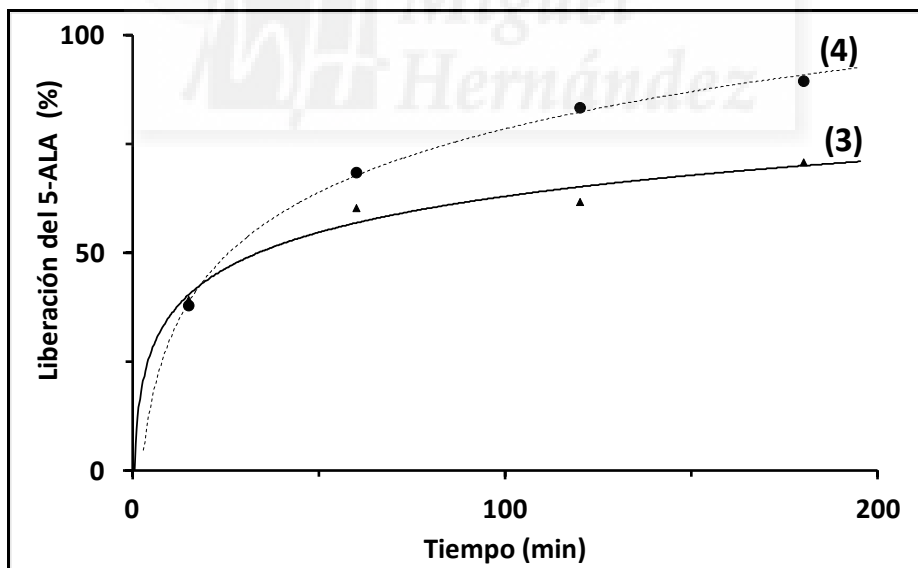


Figura 34: Cinética de liberación del 5-ALA en diferentes formulaciones poliméricas. (3) Disolución PMVEMA-ES 25% p/p. (4) Nanofibras de PMVEMA-ES 25% p/p.

En la disolución de PMVEMA-Ac previa a electrohilar, se obtiene una liberación final de 5-ALA menor del 20% (a las 3 horas) y, además alcanza esta liberación a la hora de iniciar el ensayo. La mayor parte de 5-ALA no difunde a través de la membrana probablemente porque permanece en el compartimento receptor, retenido en la disolución polimérica acuosa donde hay una elevada viscosidad y una alta afinidad por compuestos hidrófilos como el ácido 5-aminolevulínico.

En las nanofibras de PMVEMA-Ac se produce una liberación inicial del 40% en la primera hora, y sólo de un 10-20% más en las dos horas siguientes. Este perfil cinético estable, con una liberación a un ritmo lento y sostenido es debido a que el ácido 5-ALA se encuentra distribuido homogéneamente a las nanofibras de PMVEMA-Ac (figura 33). De acuerdo a esta cinética de liberación, las nanofibras de PMVEMA-Ac podrían ser unas buenas candidatas para desarrollar sistemas de liberación sostenida de fármacos hidrófilos como el ácido 5-aminolevulínico. Esto se debería confirmar mediante ensayos de liberación de 24 ó 48h de duración, pero no se han realizado ya que estas fibras van destinadas a formas farmacéuticas de parches transdérmicos donde se pretende una liberación en menos de cuatro horas y además hay que tener en cuenta que 5-ALA tiene como factor limitante la baja estabilidad en solución acuosa y es degradable a temperaturas superiores a 30 °C<sup>197,227</sup>.

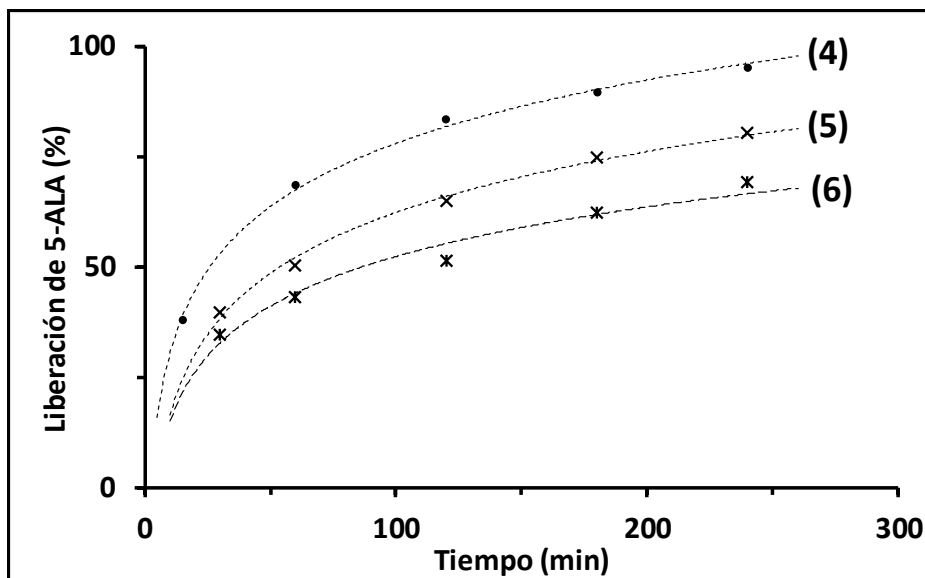
Por otra parte, en las disoluciones de PMVEMA-ES, la liberación del fármaco es prácticamente total a partir de las tres horas (figura 34). Inicialmente, en la primera hora se libera fácilmente el 60%. La matriz polimérica de PMVEMA-ES en etanol presenta menor viscosidad y afinidad por 5-ALA, por lo que la liberación es más rápida y la cantidad total liberada es igualmente superior, pero de forma



sostenida en el tiempo.

Como se aprecia en la figura 34 las nanofibras realizadas con PMVEMA-ES, presentan una liberación mayor de hasta un 70%, y además se produce prácticamente toda de manera inmediata en la primera hora. El porcentaje restante de 5-ALA parece que se libera de forma más lenta a lo largo de las siguientes tres horas que duró el estudio, también de forma mantenida en el tiempo. Una parte del ácido 5-ALA difunde rápidamente ya que presenta mayor afinidad por el medio acuoso de las celdas que por la matriz de PMVEMA-ES, mientras que la otra parte lo realiza más lentamente. Esta variación en la cinética de liberación con respecto a la matriz de PMVEMA-Ac es probablemente causada por diferencias en la homogeneidad en la incorporación del fármaco a las nanofibras, como se observó mediante las pruebas de microscopía óptica (figura 21), como consecuencia de la diferente inclusión del fármaco en dicha matriz. A la vista de los resultados obtenidos, la cinética de liberación de 5-ALA de las nanofibras de PMVEMA-ES, es rápida y más apropiada para la terapia fotodinámica, donde se busca una liberación inmediata del fotosensibilizador tras la administración tópica. Además, las nanofibras de PMVEMA-ES tienen mayor porcentaje de liberación del principio activo que las de PMVEMA-Ac. Las nanofibras poliméricas, gracias a su elevada relación superficie/volumen, presentan una gran superficie disponible para la liberación, haciendo posibles cinéticas de liberación muy rápidas.

Una vez vistos estos estudios de liberación de 5-ALA en ambas matrices, se procedió a estudiar el efecto de los polielectrolitos conjugados dentro de la matriz de PMVEMA-ES.



**Figura 35: Cinética de liberación de 5-ALA en diferentes formulaciones poliméricas de PMVEMA-ES.** (4) Fibras de PMVEMA-ES 25% p/p. (5) Con 0,75% de PFP<sup>+</sup>. (6) Con 0,75% de PFNT<sup>+</sup>.

Al incorporarse los polielectrolitos fluorescentes a las nanofibras, la cinética de liberación del 5-ALA parece que queda afectada haciéndola disminuir. La menor liberación en las fibras con los polímeros conjugados fluorescentes, podría explicarse porque estas fibras presentan diferentes características morfológicas, como un mayor diámetro y, por tanto, una menor superficie para la liberación. La liberación de 5-ALA es menor para el polielectrolito PFNT<sup>+</sup> que para el PFP<sup>+</sup> y esta diferencia, podría justificarse por un mayor impedimento estérico de anillo del naftaleno respecto del fenilo, o a interacciones polares. Estas diferencias de comportamiento, entre polifluorenos análogos de emisor azul y rojo, ya ha sido observada en la permeabilidad selectiva de gases en membranas de poli-imidas 6FDA-6FpDA<sup>228</sup>. En los experimentos de difusión aquí realizados, es

probable que el polielectrolito emisor rojo tenga un mayor impedimento estérico que el azul.

Desde el punto de vista farmacológico, se intentó ajustar los datos de liberación obtenidos sobre cuatro modelos cinéticos de liberación clásicos. Estos tipos de cinéticas describen el perfil de liberación basándose en diferentes funciones matemáticas por su simplicidad y aplicabilidad<sup>229-231</sup>.

- Modelo de orden cero: la liberación no es dependiente de la concentración.

$$M_t/M_\infty = K_0 t \quad (I).$$

Donde  $M_t/M_\infty$  es la fracción de fármaco liberado en cada tiempo, y  $K$  la constante de cada modelo expresado en las unidades correspondientes. Es típico de este modelo los sistemas transdérmicos, comprimidos matriciales con principios activos poco solubles en formas farmacéuticas recubiertas y otros sistemas.

- Modelo de primer orden: la liberación es dependiente linealmente de la concentración.

$$\ln(M_t/M_\infty) = -K_1 t \quad (II).$$

Se ha utilizado para describir la absorción diferentes sustancias, aunque es complicado relacionarlo con un mecanismo teórico. Esta liberación se utiliza para describir formas farmacéuticas matriciales que contienen principios activos solubles en agua.

- Modelo Higuchi<sup>232</sup>. Es el primer modelo matemático que se utilizó para explicar liberaciones de sistemas matriciales planas sólidas, y en el que de forma genérica y simplificada se representa como dependiente de la raíz cuadrada de tiempo.

$$M_t/M_\infty = K_h t^{1/2} \quad (\text{III}).$$

Este modelo se puede utilizar para describir la liberación de diferentes formas farmacéuticas, como pueden ser sistemas transdérmicos y pastillas con sistemas matriciales y principios activos solubles en agua.

Modelo Korsmeyer-Peppas<sup>233 234</sup>. Este modelo matemático es más genérico, y calculando el exponente de liberación (n) encontramos diferentes casos, se rige por la siguiente ecuación:

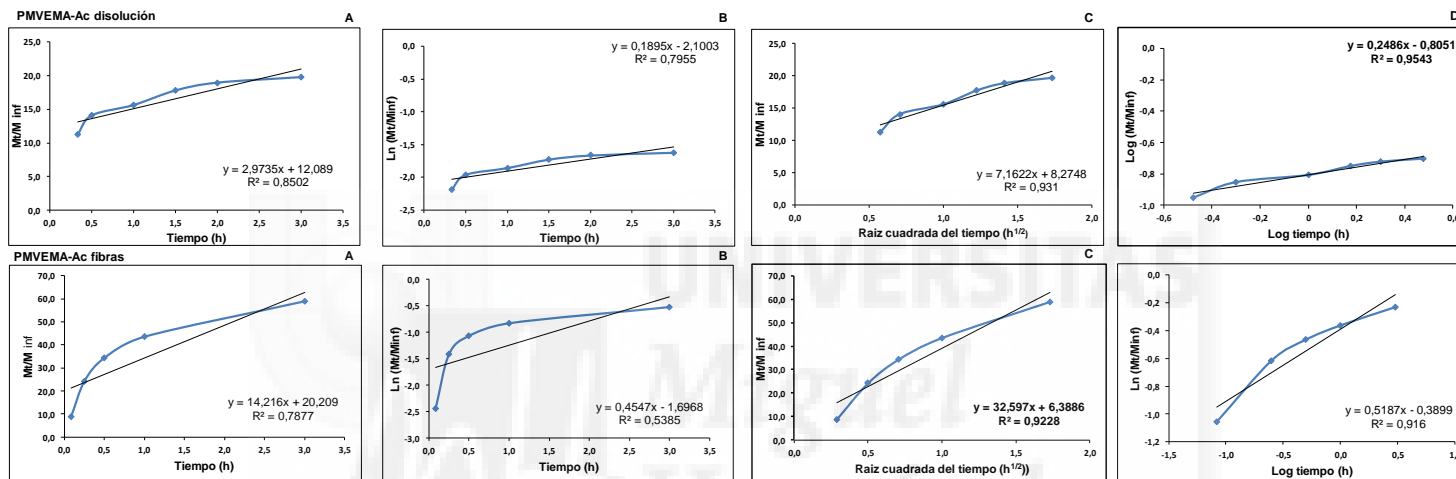
$$M_t/M_\infty = K t^n \quad (\text{IV}).$$

Para  $n=0,5$ ; correspondería con el anterior modelo que sigue la ley de Fick. Valores menores a 0,45 son una difusión cuasi fickiana mientras que los valores comprendidos entre de 0,45 y 0,89 (excepto 0,5) apuntan a un modelo de transporte no fickiano. Valores de  $n=0,89$  sería un caso de transporte de clase II y valores de  $n$  mayores a 0,89 de supertransporte de clase II. Este modelo se puede emplear siempre que el grado de liberación de la sustancia sea inferior al 60% y es aplicable principalmente a sistemas matriciales cilíndricos<sup>235</sup>.

Al enfrentar los datos experimentales de las formulaciones ensayadas (1-6) con los cuatro modelos matemáticos propuestos (I-IV) se obtuvieron diferentes resultados en cada formulación. A modo de ejemplo, en la siguiente figura se representan en detalle las

gráficas de cada ajuste con su ecuación resultante y su coeficiente de regresión al cuadrado, para la cinética de liberación del 5-ALA en la disolución PMVEMA-Ac 20% p/p y las nanofibras obtenidas de ella.





**Figura 36:** Ajustes de los diferentes modelos matemáticos de liberación cinética para la disolución de PMVEMA-Ac 20% p/p y nanofibras de PMVEMA-ES. A: Modelo Orden cero. B: Modelo Orden uno. C: Modelo Higuchi. D: Modelo Korsmeyer Peppars.

**Tabla 5:** Parámetros cinéticos de los diferentes modelos matemáticos.

Composición polimérica		Modelo cinético								
		Orden cero		Orden uno		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
Tipo	Forma	$K_0$	$R^2$	$K_1$	$R^2$	$K_h$	$R^2$	K	n	$R^2$
PMVEMA-Ac	Solución	3,0	0,85	0,19	0,54	7,2	0,93	15,7	<b>0,25</b>	<b>0,95</b>
	Fibra	14,2	0,79	0,45	0,80	32,6	<b>0,92</b>	40,8	0,52	0,92
PMVEMA-ES	Solución	12,2	0,73	0,25	0,72	25,2	0,84	55,5	<b>0,23</b>	<b>0,92</b>
	Fibra	17,9	0,86	0,22	0,75	42,1	<b>0,95</b>	64,0	<b>0,35</b>	<b>0,98*</b>
con PFP <sup>+</sup>	Fibra	16,0	0,93	0,32	0,84	41,3	<b>0,98</b>	46,3	0,51	0,96
con PFNT <sup>+</sup>	Fibra	9,5	0,98	0,19	0,94	26,4	<b>0,99</b>	43,0	0,32	0,99

\*Datos con conversión superior al 60% (modelo no fiable)

El criterio para seleccionar el modelo matemático, en **negrita y destacado** en la figura anterior, ha sido de alcanzar el mejor ajuste experimental con el valor más alto del coeficiente de regresión ( $R^2$ ). En la tabla 5 se resumen todos los datos obtenidos en el análisis de los diferentes modelos cinéticos para las diferentes formulaciones. De nuevo, los resultados en **negrita** expresan los mejores coeficientes de regresión al cuadrado ( $R^2$ ). Sin embargo, tal y como se expresa al pie de la tabla 5, en las fibras realizadas con PMVEMA-ES (**negrita y cursiva**), las conversiones para calcular estos ajustes superan el 60%, y, por tanto, no cumplen la exigencia de este modelo, aunque el valor del coeficiente sea mejor.

En general, se encuentra que todas las nanofibras presentan difusión de acuerdo a la ley de Fick y se corresponden con un modelo Higuchi<sup>232</sup>, tipificado para matrices planas sólidas mientras que las disoluciones presentan valores de  $n = 0,25-0,23$ , es decir valores inferiores a 0,45 que corresponden a una *cuasi* difusión fickiana, según Suvakanta y col.<sup>235</sup>.

El modelo Higuchi según sus características descritas coincide con las nanoestructuras presentadas en este capítulo, dado que las nanofibras son unidimensionales y planas en el aspecto macroscópico, por tanto, siguen un comportamiento de liberación análogo a este tipo de formas farmacéuticas. Las disoluciones madre preparadas para posteriormente hilar las fibras, cumplen el modelo Korsmeyer-Peppas.

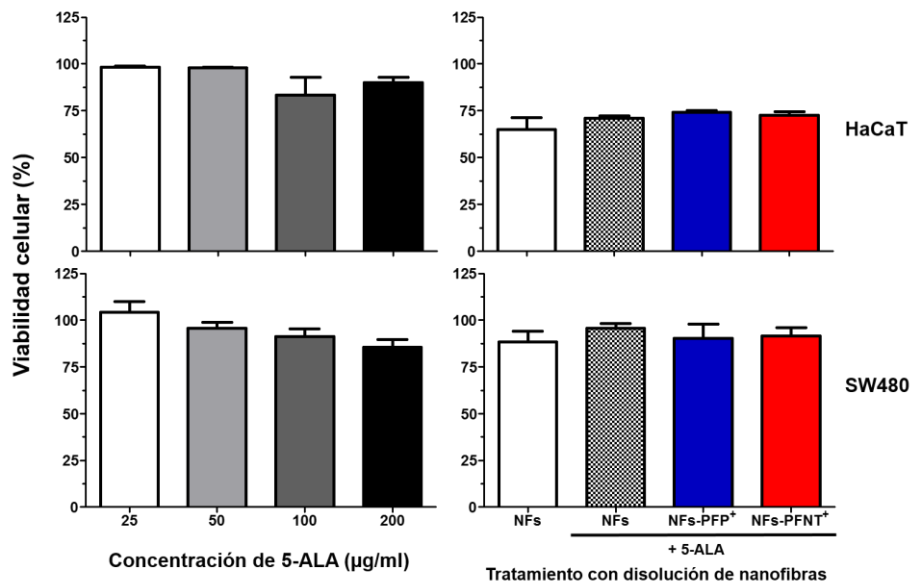


### 3.7. Ensayos *in vitro* con las líneas celulares HaCaT y SW480

#### 3.7.1. Determinación de la toxicidad producida en oscuridad por el 5-ALA y las disoluciones de las diferentes nanofibras sintetizadas

En este punto se procedió a comprobar los niveles de toxicidad inducidos en células por el 5-ALA así como por los diferentes tipos de nanofibras. Para estos ensayos se volvió a utilizar la línea celular de queratinocitos de piel humana HaCaT y otra línea celular de cáncer de colon (SW480), tejido también susceptible de un posible tratamiento con TFD. Diferentes concentraciones de 5-ALA así como de disoluciones de los diferentes tipos de fibras elaborados (una concentración única por tipo de nanofibra, 6 mg/mL en PMVEMA-ES que correspondería a 100 µg/mL de 5-ALA encapsulada) fueron incubadas con las células en su medio de cultivo durante 24h, momento en el que se determinó la viabilidad celular por MTT (figura 37).

Como se puede observar en la figura, el aumento en la concentración de 5-ALA supuso una disminución de la viabilidad celular con respecto al control en ambas líneas celulares, siendo las células SW480 levemente más sensibles a este compuesto que las HaCaT (85,6±4,3% frente a 90,0±2,8% de viabilidad celular a 200 µg/mL de 5-ALA, respectivamente).



**Figura 37. Viabilidad de células HaCaT y SW480 tratadas con 5-ALA y nanofibras en disolución.** Los tratamientos incluyeron un gradiente de concentraciones de 5-ALA y una disolución (6 mg/mL en PMVEMA-ES) de distintos tipos de nanofibras elaboradas. La viabilidad celular se muestra en %, relativo al control de células sin tratamiento.

En ninguno de los casos los niveles de viabilidad bajaron más del 85% con el tratamiento con 5-ALA. Los valores de viabilidad obtenidos para las disoluciones de nanofibras revelaron que las nanofibras de PMVEMA-ES no presentan niveles de toxicidad significativos en la línea celular SW480. Para estas células, el porcentaje mínimo de viabilidad celular fue  $88,3 \pm 5,9\%$  al tratarlas con la disolución de nanofibras sin PC ni 5-ALA. Por su parte, contrariamente a como ocurre con la respuesta al 5-ALA, la línea celular HaCaT presentó mayor sensibilidad al tratamiento con la disolución de nanofibras que la SW480. En este caso, los niveles de

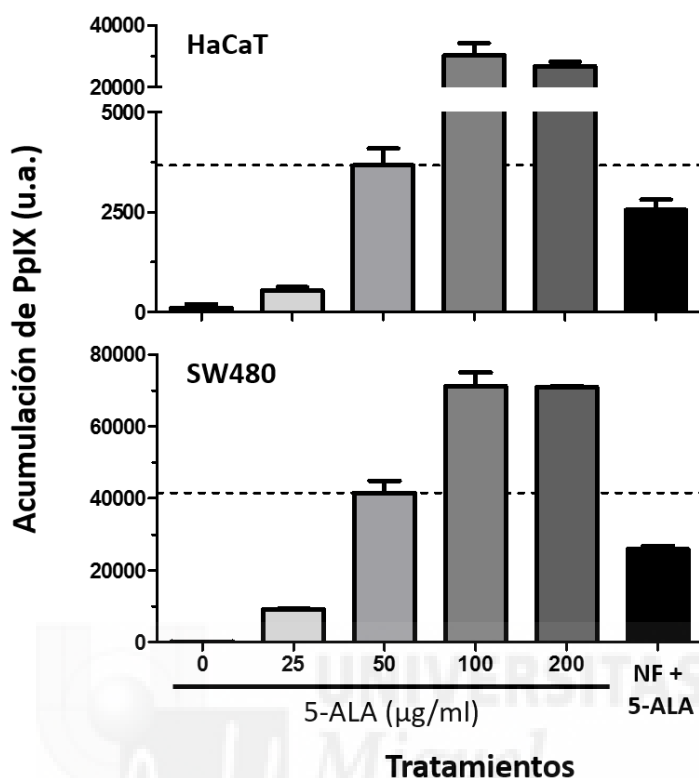
viabilidad celular en HaCaT estuvieron comprendidos entre  $64,9\pm 6,5$  y  $74,2\pm 1,0\%$ , no habiendo diferencias significativas entre los tratamientos con los diferentes tipos de fibras en disolución.

### **3.7.2. Determinación de la acumulación de PpIX en células tras su tratamiento con las fibras experimentales en disolución**

Si el proceso de elaboración de las nanofibras no ha degradado el compuesto encapsulado, la contención de este en el interior de las nanofibras es estable y su liberación se realiza sin modificación de la estructura química. Entonces, 5-ALA tendría intacta su capacidad de ser internalizado por las células y servir como sustrato para la producción de PpIX, el compuesto fotosintetizador y verdaderamente activo en la TFD. Por lo tanto, en un intento por comprobar este fenómeno, células HaCaT y SW480 fueron tratadas con una disolución de nanofibras con 5-ALA, así como un control de nanofibras vacías, de forma idéntica a como se realizó para determinar los niveles de viabilidad celular en el apartado anterior. En este caso, no se utilizaron nanofibras con PCs al solaparse sus espectros de absorción y/o emisión con los de la PpIX, lo cual conducía a la aparición de artefactos

En paralelo, las células también se incubaron con un gradiente de 5-ALA como control para comprobar la fiabilidad de la metodología y correlacionar acumulación de PpIX con concentración de 5-ALA. Tras 24h de incubación, el medio de cultivo fue retirado, las células lisadas y en un lector de placas se midió la emisión a 632 nm tras excitar las muestras a 405 nm (longitudes de onda óptimas de excitación y emisión de la PpIX).

Los resultados obtenidos (figura 38) muestran que esta técnica permite determinar de forma precisa la cantidad relativa de PpIX producida y acumulada en las células. El aumento de la concentración de 5-ALA para tratar las células se correlaciona con un aumento en la detección de PpIX que es proporcional en el rango comprendido entre 25 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . En cuanto a la cantidad de PpIX detectada en las células tratadas con la disolución de nanofibras experimentales (la medida de PpIX detectada en el control de nanofibras vacías es despreciable y no se muestra), observamos que los valores obtenidos para la disolución de nanofibras conteniendo 5-ALA son alrededor de un 25% más bajos de los esperados en comparación con la cantidad de 5-ALA liberada esperada (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Concretamente, extrapolarlo a partir de la curva de calibrado de 5-ALA para cada línea celular, estos valores corresponderían a concentraciones de  $36,9 \pm 0,6$  y  $37,4 \pm 3,4$   $\mu\text{g/LI}$  para HaCaT y SW480, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse, entre otros factores, a una cinética de liberación diferente al cambiar las condiciones experimentales.



**Figura 38. Determinación de la producción y acumulación intracelular de PpIX tras el tratamiento con nanofibras experimentales en disolución.** Las células fueron tratadas durante 24h con un gradiente de concentraciones de 5-ALA y una disolución de nanofibras vacías y con 5-ALA (6 mg/mL en PMVEMA-ES) pero sin PC. En el tratamiento con nanofibras vacías no se detectó acumulación de PpIX y no están incluidas en la gráfica. La línea discontinua indica la acumulación de PpIX correspondiente a la cantidad de 5-ALA potencialmente liberada de las nanofibras en disolución en 30 min (cantidad deducida de los ensayos de liberación mostrados en la sección 3.6 de este capítulo).

Para concluir, y a la vista de estos resultados, se puede deducir que la PpIX formada, a partir de la administración de 5-ALA con las nanofibras experimentales, es potencialmente activa. La metodología empleada para ello viene descrita en el apartado 2.2.12 de la sección de material y métodos de este capítulo. Próximos estudios en curso están siendo elaborados en nuestro grupo de investigación con la intención de conseguir muerte celular controlada por acción lumínica, como consecuencia de la aplicación de TFD.





**CAPÍTULO V**

**CONCLUSIONES**





En la presente tesis doctoral se han diseñado y desarrollado dos tipos de nanoestructuras poliméricas atendiendo a la aplicación final. Por un lado, nanopartículas con antibióticos hospitalarios (amikacina, neomicina, ciprofloxacino y cefalosporina) en actividad antibacteriana y nanopartículas fluorescentes en bioimagen celular. Por el otro, nanofibras con ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) en parches transdérmicos para fototerapia dinámica.

En ambos casos, el sistema de polímeros empleado ha consistido en el mismo polímero base con característica transportadora y biocompatible: monoéster de poli (vinil metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico) (PMVEMA-ES) al que se le añade un polielectrolito conjugado (PC: emisor azul; PFP<sup>+</sup> o rojo; PFNT<sup>+</sup>) con propiedades fluorescentes únicas.

- Las nanopartículas fluorescentes (con PCs) de un tamaño aproximado de 200 nm, dieron como resultado sistemas nanoestructurados con un alto rendimiento de fluorescencia y muy estables en medio acuoso. Esta propiedad se empleó en la visualización de diferentes líneas celulares: Hela S3 (cáncer de cérvix) y 3T3 (fibroblastos de ratón) y también en cultivos primarios de corteza cerebral y retina de rata embrionada, donde las nanopartículas se localizan y acumulan principalmente en las cercanías de las mitocondrias.
- Ambos polielectrolitos, PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>, son marcadores fluorescentes de membranas celulares y bacterianas Gram positivas y Gram negativas, siendo PFNT<sup>+</sup> más selectivo por membranas bacterianas que PFP<sup>+</sup>. Ambos PCs presentaron CI<sub>90</sub> de 0,75 μM mediante la determinación por unidades formadoras de colonias.
- La toxicidad de los PCs y sus nanopartículas fue analizada en diferentes líneas celulares: HaCat (queratinocitos de piel) y HT29

(cáncer de colon). Las nanopartículas con polielectrolitos no resultaron ser tóxicas en las líneas celulares estudiadas con una viabilidad celular siempre superior al 85%, incluyendo en este valor aquellos obtenidos a las concentraciones más altas probadas.

- La eficacia de encapsulación de los antibióticos en las nanopartículas depende de la estructura del antibiótico, resultando mejor la cefotaxima con un 69% de fármaco encapsulado frente al 59% del ciprofloxacino y ambos antibióticos mucho más encapsulados que los aminoglucósidos: neomicina con un 40% y amikacina un 14%.
- Las formulaciones de las distintas nanopartículas fueron examinadas con cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* procedentes de muestras hospitalarias para evaluar su actividad antibacteriana:
  - En todas las cepas probadas, la amikacina y la cefotaxima encapsuladas con PMVEMA-ES mejoran sus resultados frente a los valores de CMI sin encapsular.
  - La adición de PFNT<sup>+</sup> en la formulación de amikacina aumenta al doble la efectividad de su actividad antimicrobiana.
  - La encapsulación de cefotaxima añadiendo PFP<sup>+</sup> mejora su efectividad en todas las especies bacterianas sensibles.
- Las nanofibras fueron preparadas y optimizadas por primera vez en función de parámetros experimentales de electrohilatura para dos tipos de polímeros base: ácido y monoéster de polivinil metil vinil éter-*alt*-anhídrido maléico (PMVEMA-Ac y PMVEMA-ES, respectivamente) y de dos polielectrolitos conjugados (PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>).
- Las nanofibras, conteniendo 5-ALA, fueron en todos los casos de diámetro inferior a 150 nm, preparadas por electrohilatura y

caracterizadas en tamaño, eficiencia de encapsulación y fluorescencia.

- Las nanofibras fluorescentes (con PFP<sup>+</sup> y PFNT<sup>+</sup>) mantienen un alto rendimiento de fluorescencia en estado sólido, sin alterar la estructura. La incorporación de 5-ALA tampoco modifica las propiedades morfológicas del material, preservando la estabilidad del compuesto en el interior de la fibra.
- Se ha estudiado la cinética de liberación de 5-ALA en las nanofibras de las diferentes composiciones, con test normalizados en celdas verticales. Ambas matrices poliméricas (PMVEMA-Ac y PMVEMA-ES) mostraron cinéticas de liberación rápida que se adaptan a las características farmacocinéticas de interés en terapia fotodinámica. En todos los casos, las nanofibras siguen una cinética Higuchi, típica de formulaciones de soporte plano y sólido, mientras que las disoluciones, antes de hilar, se liberan con una cinética tipo pseudo-fickiniana.
- Se ha evaluado la toxicidad en ausencia de luz de las nanofibras que resultaron no ser tóxicas en las líneas celulares HaCat (queratinocitos) y SW80 (cáncer de colon) al igual que ocurría en la nanopartículas. Las nanofibras con 5-ALA, con y sin polielectrolito, no influye en la generación de PpIX, por lo que es una adecuada forma farmacéutica para terapia fotodinámica.





## **BIBLIOGRAFÍA**



- 1 Liu, Y., Miyoshi, H. & Nakamura, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International Journal of Cancer* **120**, 2527-2537, doi:10.1002/ijc.22709 (2007).
- 2 Vasir, J. K. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 718-728, doi:10.1016/j.addr.2007.06.003 (2007).
- 3 Langer, R. & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **428**, 487-492, doi:10.1038/nature02388 (2004).
- 4 Andrianantoandro, E. Next-generation therapeutics. *Trends in biotechnology* **32**, 431-432 (2014).
- 5 Sumerlin, B. S. & Vogt, A. P. Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules*, 1-13, doi: 10.1021/ma901447e (2010).
- 6 Merkel, O. M., Marsh, L. M., Garn, H. & Kissel, T. Flow cytometry-based cell type-specific assessment of target regulation by pulmonary siRNA delivery. *Methods in Molecular Biology* **948**, 263-273, doi:10.1007/978-1-62703-140-0\_18 (2013).
- 7 Zhang, X., Zhang, Y., Liu, X., Fang, A., Li, P., Li, Z., Liu, T., Yang, Y., Du, L. & Wang, C. MicroRNA-203 Is a Prognostic Indicator in Bladder Cancer and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin via Apoptosis by Targeting Bcl-w and Survivin. *PLoS One* **10**, e0143441, doi:10.1371/journal.pone.0143441 (2015).
- 8 Teixeira, A. I., Duckworth, J. K. & Hermanson, O. Getting the right stuff: controlling neural stem cell state and fate in vivo and in vitro with biomaterials. *Cell research* **17**, 56-61 (2007).
- 9 Inoue, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *International Journal of Urology* **24**, 97-101, doi:10.1111/iju.13291 (2017).
- 10 Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Wańczyk, M., Bojarczuk, K. & Golab, J. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules* **16**, 4140-4164 (2011).
- 11 Kiss, L. B., Soderlund, J., Niklasson, G. A. & Granqvist, C. G. New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles. *Nanotechnology*, 25-28 (1999).
- 12 Edition, A. S.-N. CLSI document M07-A9. *Clinical and Laboratory Standards Institute* **950** (2012).
- 13 Li, Q., Cai, T., Huang, Y., Xia, X., Cole, S. & Cai, Y. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials* **7**, 122 (2017).

- 14 Folkman, J. & Long, D. M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *Journal of surgical research* **4**, 139-142 (1964).
- 15 Merkle, H. P. Drug delivery's quest for polymers: where are the frontiers? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **97**, 293-303 (2015).
- 16 Duncan, R. & Vicent, M. J. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: the end of the beginning. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 60-70 (2013).
- 17 Chen, Z. G. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* **16**, 594-602, doi:10.1016/j.molmed.2010.08.001 (2010).
- 18 Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M. J. & Irache, J. M. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **12**, 251-259 (2001).
- 19 Arnedo, A., Espuelas, S. & Irache, J. M. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *International Journal of Pharmaceutics* **244**, 59-72 (2002).
- 20 Traub, W. & Piez, K. A. The chemistry and structure of collagen. *Advances in Protein Chemistry* **25**, 243-352 (1971).
- 21 Padalkar, S., Capadona, J. R., Rowan, S. J., Weder, C., Won, Y. H., Stanciu, L. A. & Moon, R. J. Natural biopolymers: novel templates for the synthesis of nanostructures. *Langmuir* **26**, 8497-8502, doi:10.1021/la904439p (2010).
- 22 Sanna, V., Siddiqui, I. A., Sechi, M. & Mukhtar, H. Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. *Molecular Pharmacology* **10**, 3871-3881, doi:10.1021/mp400342f (2013).
- 23 Ikada, Y. & Tsuji, H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 117-132 (2000).
- 24 Lemoine, D., Francois, C., Kedzierewicz, F., Preat, V., Hoffman, M. & Maincent, P. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* **17**, 2191-2197 (1996).
- 25 Li, Y., Zhu, K. J., Zhang, J. X., Jiang, H. L., Liu, J. H., Hao, Y. L., Yasuda, H., Ichimaru, A. & Yamamoto, K. In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and epsilon-caprolactone: comparison with conventional PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* **295**, 67-76, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.01.025 (2005).



- 26 Jameela, S. R., Latha, P. G., Subramoniam, A. & Jayakrishnan, A. Antitumour activity of mitoxantrone-loaded chitosan microspheres against Ehrlich ascites carcinoma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **48**, 685-688 (1996).
- 27 Zili, Z., Sfar, S. & Fessi, H. Preparation and characterization of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics* **294**, 261-267, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.01.020 (2005).
- 28 Ferrer, M., Sanz, M. I., Gastaminza, G., del Pozo, V., de Souza, J. & Irache, J. M. New pharmaceutical dosage forms for allergy treatment. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **35**, 41-51 (2012).
- 29 Kwon, G. S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **20**, 357-403 (2003).
- 30 Gaucher, G., Dufresne, M. H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D. & Leroux, J. C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **109**, 169-188, doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.034 (2005).
- 31 Garrido, L., Ibarra, L. & Marco, C. Ciencia y tecnología de materiales poliméricos *Ed; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC). II*, 573-596 (Madrid, 2004).
- 32 Gopferich, A. & Tessmar, J. Polyanhydride degradation and erosion. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 911-931 (2002).
- 33 Salman, H. H. A., Gamazo, D. L. R. C., Agüeros, B. M. & Irache, G. J. M. (WO 2007138135 A1, 2007).
- 34 Ashland. Ashland/Home. <http://www.ashland.com>
- 35 Mo, Y., Peck, G. E., Heyd, A. & Banker, G. S. Recording pH method of characterizing composition and monitoring dissolution profile of an anhydride-acid copolymer and its salt derivatives. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **66**, 713-717 (1977).
- 36 Inc., I. I. *ispcorp/Home*. <http://www.ispcorp.com>
- 37 Lappas, L. C. & McKeegan, W. Polymeric Pharmaceutical Coating Materials. I. Preparation and Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **54**, 176-181 (1965).
- 38 Irache, J. M., Huici, M., Konecny, M., Espuelas, S., Campanero, M. A. & Arbos, P. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules* **10**, 126-145 (2005).
- 39 Ripolin, A., Quinn, J., Larraneta, E., Vicente-Perez, E. M., Barry, J. & Donnelly, R. F. Successful application of large microneedle patches by human volunteers. *International Journal of Pharmaceutics* **521**, 92-101, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.02.011 (2017).

- 40 Agüeros, B. M., Esparza, C. I., González, F. C., González, N. C. J., Irache, G. J. M. & Romo, H. A. (WO 2012007628 A1, 2012).
- 41 Liu, Y., Ogawa, K. & Schanze, K. S. Conjugated polyelectrolytes as fluorescent sensors. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **10**, 173-190 (2009).
- 42 Duarte, A., Pu, K.-Y., Liu, B. & Bazan, G. C. Recent advances in conjugated polyelectrolytes for emerging optoelectronic applications. *Chemistry of Materials* **23**, 501-515 (2010).
- 43 Wang, L., Li, H. & Cao, D. Conjugated polyelectrolytes: Synthesis and application in biomolecule detection. *Current Organic Chemistry* **16**, 1468-1484 (2012).
- 44 Tapia, M. J., Montserin, M., Valente, A. J., Burrows, H. D. & Mallavia, R. Binding of polynucleotides to conjugated polyelectrolytes and its applications in sensing. *Advances in Colloid and Interface Science* **158**, 94-107, doi:10.1016/j.cis.2009.09.001 (2010).
- 45 Feng, F., Wang, H., Han, L. & Wang, S. Fluorescent conjugated polyelectrolyte as an indicator for convenient detection of DNA methylation. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 11338-11343 (2008).
- 46 Ambade, A. V., Sandanaraj, B. S., Klaikherd, A. & Thayumanavan, S. Fluorescent polyelectrolytes as protein sensors. *Polymer international* **56**, 474-481 (2007).
- 47 Zhu, C., Liu, L., Yang, Q., Lv, F. & Wang, S. Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy. *Chemical Reviews* **112**, 4687-4735, doi:10.1021/cr200263w (2012).
- 48 Li, K. & Liu, B. Water-soluble conjugated polymers as the platform for protein sensors. *Polymer Chemistry* **1**, 252-259 (2010).
- 49 Liu, B. & Bazan, G. C. Homogeneous fluorescence-based DNA detection with water-soluble conjugated polymers. *Chemistry of materials* **16**, 4467-4476 (2004).
- 50 Pinto, M. R. & Schanze, K. S. Conjugated polyelectrolytes: Synthesis and applications. *Synthesis* **2002**, 1293-1309 (2002).
- 51 Tan, C., Pinto, M. R. & Schanze, K. S. Photophysics, aggregation and amplified quenching of a water-soluble poly(phenylene ethynylene). *Chemical Communications*, 446-447 (2002).
- 52 Lavigne, J. J., Broughton, D. L., Wilson, J. N., Erdogan, B. & Bunz, U. H. "Surfactochromic" conjugated polymers: surfactant effects on sugar-substituted PPEs. *Macromolecules* **36**, 7409-7412 (2003).

- 53 Burrows, H. D., Tapia, M. J., Fonseca, S. M., Valente, A. J., Lobo, V. M., Justino, L. L., Qiu, S., Pradhan, S., Scherf, U. & Chattopadhyay, N. Aqueous Solution Behavior of Anionic Fluorene-co-thiophene-Based Conjugated Polyelectrolytes. *ACS Applied Materials & Interfaces* **1**, 864-874 (2009).
- 54 Burrows, H., Lobo, V., Pina, J., Ramos, M., De Melo, J. S., Valente, A., Tapia, M., Pradhan, S., Scherf, U. & Hintschich, S. Interactions between surfactants and {1, 4-phenylene-[9, 9-bis (4-phenoxy-butylsulfonate)] fluorene-2, 7-diyl}. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **270**, 61-66 (2005).
- 55 Knaapila, M., Almásy, L., Garamus, V. M., Pearson, C., Pradhan, S., Petty, M. C., Scherf, U., Burrows, H. D. & Monkman, A. P. Solubilization of polyelectrolytic hairy-rod polyfluorene in aqueous solutions of nonionic surfactant. *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 10248-10257 (2006).
- 56 Wang, S. & Bazan, G. C. Solvent-dependent aggregation of a water-soluble poly (fluorene) controls energy transfer to chromophore-labeled DNA. *Chemical communications*, 2508-2509 (2004).
- 57 Burrows, H. D., Tapia, M. J., Fonseca, S. M., Pradhan, S., Scherf, U., Silva, C. L., Pais, A. A., Valente, A. J., Schillén, K. & Alfredsson, V. Solubilization of Poly {1, 4-phenylene-[9, 9-bis (4-phenoxy-butylsulfonate)] fluorene-2, 7-diyl} in Water by Nonionic Amphiphiles. *Langmuir* **25**, 5545-5556 (2009).
- 58 Chen, L., McBranch, D., Wang, R. & Whitten, D. Surfactant-induced modification of quenching of conjugated polymer fluorescence by electron acceptors: applications for chemical sensing. *Chemical Physics Letters* **330**, 27-33 (2000).
- 59 Kido, J., Hongawa, K., Okuyama, K. & Nagai, K. White light-emitting organic electroluminescent devices using the poly (N-vinylcarbazole) emitter layer doped with three fluorescent dyes. *Applied Physics Letters* **64**, 815-817 (1994).
- 60 Wang, H., Lu, P., Wang, B., Qiu, S., Liu, M., Hanif, M., Cheng, G., Liu, S. & Ma, Y. A Water-Soluble  $\pi$ -Conjugated Polymer with up to 100 mg· mL<sup>-1</sup> Solubility. *Macromolecular rapid communications* **28**, 1645-1650 (2007).
- 61 Jiang, H., Taranekar, P., Reynolds, J. R. & Schanze, K. S. Conjugated polyelectrolytes: synthesis, photophysics, and applications. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 4300-4316 (2009).
- 62 Mallavia, R., Martínez-Pérez, D., Chmelka, B. & Bazán, G. Películas fluorescentes azules basadas en derivados de poli-2, 7-fluorenofenilideno. *Boletín Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* **43**, 327-330 (2004).

- 63 Burrows, H., Lobo, V., Pina, J., Ramos, M., Seixas de Melo, J., Valente, A., Tapia, M., Pradhan, S. & Scherf, U. Fluorescence enhancement of the water-soluble poly {1, 4-phenylene-[9, 9-bis-(4-phenoxybutylsulfonate)] fluorene-2, 7-diyl} copolymer in n-dodecylpentaoxyethylene glycol ether micelles. *Macromolecules* **37**, 7425-7427 (2004).
- 64 Tapia, M., Monteserín, M., Costoyas, A., Burrows, H., Marques, A., Pais, A., Valente, A., Mallavia, R., Scherf, U. & Pinazo, A. Effects of commercial non-ionic alkyl oxyethylene and ionic biocompatible arginine-based surfactants on the photophysical behaviour of several poly (fluorene-1, 4-phenylene) s. *Journal of Molecular Liquids* **156**, 18-27 (2010).
- 65 Tapia, M. J., Burrows, H. D., Knaapila, M., Monkman, A. P., Arroyo, A., Pradhan, S., Scherf, U., Pinazo, A., Perez, L. & Moran, C. Interaction between the conjugated polyelectrolyte poly{1,4-phenylene[9,9-bis(4-phenoxybutylsulfonate)]fluorene-2,7-diyl} copolymer and the lecithin mimic 1-O-(l-Arginyl)-2,3-O-dilauroyl-sn-glycerol in aqueous solution. *Langmuir* **22**, 10170-10174, doi:10.1021/la0612217 (2006).
- 66 Al Attar, H. A. & Monkman, A. P. Effect of surfactant on water-soluble conjugated polymer used in biosensor. *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 12418-12426 (2007).
- 67 Li, K. & Liu, B. Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging. *Chemical Society Reviews* **43**, 6570-6597 (2014).
- 68 Monteserín, M., Burrows, H. D., Valente, A. J., Lobo, V. M., Mallavia, R., Tapia, M. J., Garcia-Zubiri, I. X., Di Paolo, R. E. & Macanita, A. L. Modulating the emission intensity of poly-(9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium)hexyl)-fluorene phenylene) bromide through interaction with sodium alkylsulfonate surfactants. *Journal of Physical Chemistry B* **111**, 13560-13569, doi:10.1021/jp0741760 (2007).
- 69 Martínez-Tomé, M. J., Esquembre, R. o., Mallavia, R. & Mateo, C. R. Formation of Complexes between the Conjugated Polyelectrolyte Poly {[9, 9-bis (6'-N, N, N-trimethylammonium) hexyl] fluorene-phenylene} Bromide (HTMA-PFP) and Human Serum Albumin. *Biomacromolecules* **11**, 1494-1501 (2010).
- 70 Pinto, S. M., Burrows, H. D., Pereira, M. M., Fonseca, S. M., Dias, F. B., Mallavia, R. & Tapia, M. J. Singlet- Singlet Energy Transfer in Self-Assembled Systems of the Cationic Poly {9, 9-bis [6-N, N, N-trimethylammonium) hexyl] fluorene-co-1, 4-phenylene} with Oppositely Charged Porphyrins. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 16093-16100 (2009).
- 71 Burrows, H. D., Costa, T., Ramos, M. L., Valente, A. J., Stewart, B., Justino, L. L., Almeida, A. I., Catarina, N. L.,

- Mallavia, R. & Knaapila, M. Self-assembled systems of water soluble metal 8-hydroxyquinolates with surfactants and conjugated polyelectrolytes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 16629-16640 (2016).
- 72 Kahveci, Z., Martínez-Tomé, M. J., Mallavia, R. & Mateo, C. R. Use of the Conjugated Polyelectrolyte Poly {[9, 9-bis (6'-N, N, N-trimethylammonium) hexyl] fluorene-phenylene} Bromide (HTMA-PFP) as a Fluorescent Membrane Marker. *Biomacromolecules* **14**, 1990-1998 (2013).
- 73 Davies, M. L., Douglas, P., Burrows, H. D., Martincigh, B., Miguel, M. d. G. a., Scherf, U., Mallavia, R. & Douglas, A. In Depth Analysis of the Quenching of Three Fluorene-Phenylene-Based Cationic Conjugated Polyelectrolytes by DNA and DNA Bases. *The Journal of Physical Chemistry B* **118**, 460-469 (2013).
- 74 Kahveci, Z., Vazquez-Guillo, R., Mira, A., Martinez, L., Falco, A., Mallavia, R. & Mateo, C. R. Selective recognition and imaging of bacterial model membranes over mammalian ones by using cationic conjugated polyelectrolytes. *Analyst* **141**, 6287-6296, doi:10.1039/c6an01427e (2016).
- 75 Feng, F., He, F., An, L., Wang, S., Li, Y. & Zhu, D. Fluorescent conjugated polyelectrolytes for biomacromolecule detection. *Advanced Materials* **20**, 2959-2964 (2008).
- 76 Rininsland, F., Xia, W., Wittenburg, S., Shi, X., Stankewicz, C., Achyuthan, K., McBranch, D. & Whitten, D. Metal ion-mediated polymer superquenching for highly sensitive detection of kinase and phosphatase activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15295-15300 (2004).
- 77 Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Kluwer Academic/Plenum Publishers* (New York, 1999).
- 78 Rehahn, M., Schlüter, A.-D., Wegner, G. & Feast, W. J. Soluble poly (para-phenylene) s. 2. Improved synthesis of poly (para-2, 5-di-n-hexylphenylene) via Pd-catalysed coupling of 4-bromo-2, 5-di-n-hexylbenzeneboronic acid. *Polymer* **30**, 1060-1062 (1989).
- 79 Chen, Y. & Shi, G. Fluorescence Detection and Discrimination of ss- and ds-DNA with a Water Soluble Oligopyrene Derivative. *Sensors (Basel)* **9**, 4164-4177, doi:10.3390/s90604164 (2009).
- 80 Feng, X., Xu, Q., Liu, L. & Wang, S. A new light-harvesting conjugated polyelectrolyte microgel for DNA and enzyme detections. *Langmuir* **25**, 13737-13741, doi:10.1021/la901444c (2009).

- 81 Song, H., Sun, B., Gu, K. J., Yang, Y., Zhang, Y. & Shen, Q. D. Interactions between cationic conjugated polyelectrolyte and DNA and a label-free method for DNA detection based on conjugated polyelectrolyte complexes. *Journal of applied polymer science* **114**, 1278-1286 (2009).
- 82 Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nature Medicine* **9**, 123-128, doi:10.1038/nm0103-123 (2003).
- 83 Leevy, W. M., Gammon, S. T., Johnson, J. R., Lampkins, A. J., Jiang, H., Marquez, M., Piwnica-Worms, D., Suckow, M. A. & Smith, B. D. Noninvasive optical imaging of staphylococcus aureus bacterial infection in living mice using a Bis-dipicolylamine-Zinc(II) affinity group conjugated to a near-infrared fluorophore. *Bioconjugate Chemistry* **19**, 686-692, doi:10.1021/bc700376v (2008).
- 84 Zhou, J., Butchosa, N., Jayawardena, H. S., Park, J., Zhou, Q., Yan, M. & Ramstrom, O. Synthesis of multifunctional cellulose nanocrystals for lectin recognition and bacterial imaging. *Biomacromolecules* **16**, 1426-1432, doi:10.1021/acs.biomac.5b00227 (2015).
- 85 Kim, S., Lim, C. K., Na, J., Lee, Y. D., Kim, K., Choi, K., Leary, J. F. & Kwon, I. C. Conjugated polymer nanoparticles for biomedical in vivo imaging. *Chemical Communications* **46**, 1617-1619, doi:10.1039/b923309a (2010).
- 86 Pu, K. Y. & Liu, B. Fluorescent conjugated polyelectrolytes for bioimaging. *Advanced Functional Materials* **21**, 3408-3423 (2011).
- 87 Smith, B. A. & Smith, B. D. Biomarkers and molecular probes for cell death imaging and targeted therapeutics. *Bioconjugate Chemistry* **23**, 1989-2006, doi:10.1021/bc3003309 (2012).
- 88 Kahveci, Z., Vazquez-Guillo, R., Martinez-Tome, M. J., Mallavia, R. & Mateo, C. R. New Red-Emitting Conjugated Polyelectrolyte: Stabilization by Interaction with Biomolecules and Potential Use as Drug Carriers and Bioimaging Probes. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 1958-1969, doi:10.1021/acsami.5b10167 (2016).
- 89 Ngo, A. T., Karam, P. & Cosa, G. Conjugated polyelectrolyte–lipid interactions: opportunities in biosensing. *Pure and Applied Chemistry* **83**, 43-55 (2010).
- 90 Ngo, A. T. & Cosa, G. Assembly of zwitterionic phospholipid/conjugated polyelectrolyte complexes: Structure and photophysical properties. *Langmuir* **26**, 6746-6754 (2009).
- 91 Allemann, E., Leroux, J. C., Gurny, R. & Doelker, E. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid)

- nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharmaceutical Research* **10**, 1732-1737 (1993).
- 92 Vasir, J. K. & Labhasetwar, V. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **3**, 325-344, doi:10.1517/17425247.3.3.325 (2006).
- 93 Irache, G. J. M., Huarte, C. J., Inchaurreaga, C. L., Ruiz, G. L. F. & Martín, A. N. (WO 2016087340 A1, Juny 9, 2016).
- 94 Salman, H. H. A. & Azcarate, I. G. (US 20140161892 A1, Juny 12, 2014).
- 95 Vrignaud, S., Benoit, J. P. & Saulnier, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 8593-8604, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.057 (2011).
- 96 Krauel, M. K., Pitaksuteepong, T., Davies, N. M. & Rades, T. Entrapment of bioactive molecules in poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *American Journal of Drug Delivery* **2**, 251-259 (2004).
- 97 Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K. & González-Méndez, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿ la (r) evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química* **27**, 286-291 (2016).
- 98 Ramamoorth, M. & Narvekar, A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* **9**, GE01 (2015).
- 99 Foglia, S., Ledda, M., Fioretti, D., Iucci, G., Papi, M., Capellini, G., Lolli, M. G., Grimaldi, S., Rinaldi, M. & Lisi, A. In vitro biocompatibility study of sub-5 nm silica-coated magnetic iron oxide fluorescent nanoparticles for potential biomedical application. *Scientific Reports* **7** (2017).
- 100 Suchomel, P., Kvittek, L., Panacek, A., Pucek, R., Hrbac, J., Vecerova, R. & Zboril, R. Comparative study of antimicrobial activity of AgBr and Ag nanoparticles (NPs). *PloS one* **10**, e0119202 (2015).
- 101 Zhao, J., Pinchuk, A. O., McMahon, J. M., Li, S., Ausman, L. K., Atkinson, A. L. & Schatz, G. C. Methods for describing the electromagnetic properties of silver and gold nanoparticles. *Acc Chem Res* **41**, 1710-1720, doi:10.1021/ar800028j (2008).
- 102 Mathiowitz, E., Chickering, D. E. & Lehr, C.-M. *Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development*. (CRC Press, 1999).
- 103 Akagi, T., Baba, M. & Akashi, M. Preparation of nanoparticles by the self-organization of polymers consisting of hydrophobic and hydrophilic segments: potential applications. *Polymer* **48**, 6729-6747 (2007).

- 104 Müller, K., Bugnicourt, E., Latorre, M., Jorda, M., Echegoyen Sanz, Y., Lagaron, J. M., Miesbauer, O., Bianchin, A., Hankin, S. & Bölz, U. Review on the processing and properties of polymer nanocomposites and nanocoatings and their applications in the packaging, automotive and solar energy fields. *Nanomaterials* **7**, 74 (2017).
- 105 Pison, U., Welte, T., Giersig, M. & Groneberg, D. A. Nanomedicine for respiratory diseases. *European Journal of Pharmacology* **533**, 341-350 (2006).
- 106 Virovic, L., Wu, C. H., Konishi, M. & Wu, G. Y. Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. *Expert opinion on drug delivery* **2**, 707-717 (2005).
- 107 Zale, S. E., Troiano, G., Ali, M. M., Hrkach, J. & Wright, J. (laUS 8613951 B2, 2017).
- 108 Yildiz, I., Shukla, S. & Steinmetz, N. F. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current opinion in biotechnology* **22**, 901-908 (2011).
- 109 Mocan, L., Matea, C., Tabaran, F. A., Mosteanu, O., Pop, T., Puia, C., Agoston-Coldea, L., Zaharie, G., Mocan, T. & Buzoianu, A. D. Selective ex vivo photothermal nano-therapy of solid liver tumors mediated by albumin conjugated gold nanoparticles. *Biomaterials* **119**, 33-42 (2017).
- 110 Jiao, P. F., Zhou, H. Y., Chen, L. X. & Yan, B. Cancer-targeting multifunctionalized gold nanoparticles in imaging and therapy. *Current Medicinal Chemistry* **18**, 2086-2102 (2011).
- 111 Parveen, S., Misra, R. & Sahoo, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **8**, 147-166 (2012).
- 112 Niemirowicz, K., Markiewicz, K., Wilczewska, A. & Car, H. Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. *Advances in medical sciences* **57**, 196-207 (2012).
- 113 Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B. & Vahaboglu, H. Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine* **4** (2016).
- 114 Marinho, C. M., Santos, T., Gonçalves, A., Poeta, P. & Igrejas, G. A decade-long commitment to antimicrobial resistance surveillance in Portugal. *Frontiers in Microbiology* **7** (2016).
- 115 Gillings, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Frontiers in microbiology* **4** (2013).
- 116 Control, C. f. D. & Prevention. Provisional CDC guidelines for the use and safety monitoring of bedaquiline fumarate (Sirturo) for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *MMWR*.



- Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* **62**, 1 (2013).
- 117 Walsh, F. & Duffy, B. The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PLoS One* **8**, e65567 (2013).
- 118 Park, J. W., Park, S. R., Nepal, K. K., Han, A. R., Ban, Y. H., Yoo, Y. J., Kim, E. J., Kim, E. M., Kim, D. & Sohng, J. K. Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation. *Nature chemical biology* **7**, 843-852 (2011).
- 119 McWilliam, S. J., Antoine, D. J., Smyth, R. L. & Pirmohamed, M. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. *Pediatric Nephrology*, 1-11 (2016).
- 120 Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Soudi, M. R., Gamazo, C. & Irache, J. M. Amikacin loaded PLGA nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Pharm Sci* **93**, 392-398, doi:10.1016/j.ejps.2016.08.049 (2016).
- 121 Varshosaz, J., Ghaffari, S., Mirshojaei, S. F., Jafarian, A., Atyabi, F., Kobarfard, F. & Azarmi, S. Biodistribution of amikacin solid lipid nanoparticles after pulmonary delivery. *Biomed Res Int* **2013**, 136859, doi:10.1155/2013/136859 (2013).
- 122 Al Sibae, M. R. & McGuire, B. M. Current trends in the treatment of hepatic encephalopathy. *Therapeutics and clinical risk management* **5**, 617 (2009).
- 123 Miettinen, T. A. Effects of neomycin alone and in combination with cholestyramine on serum cholesterol and fecal steroids in hypercholesterolemic subjects. *Journal of Clinical Investigation* **64**, 1485 (1979).
- 124 Wang, Z., Tan, J., McConville, C., Kannappan, V., Tawari, P. E., Brown, J., Ding, J., Armesilla, A. L., Irache, J. M., Mei, Q. B., Tan, Y., Liu, Y., Jiang, W., Bian, X. W. & Wang, W. Poly lactic-co-glycolic acid controlled delivery of disulfiram to target liver cancer stem-like cells. *Nanomedicine* **13**, 641-657, doi:10.1016/j.nano.2016.08.001 (2017).
- 125 Khan, A., Iqbal, Z., Khan, J. A., Khan, M. I., Khan, G. S., Bilal, M. & Khan, T. M. The Development and Validation of HPLC-UV method for Analysis of Ciprofloxacin in serum and aqueous Humour. *Archives of Pharmacy Practice* **2**, 116 (2011).
- 126 Stirbet, D., Litescu, S.-C. & Radu, G.-L. Chromatographic analysis of immobilized cefotaxime. *Journal of the Serbian Chemical Society* **79**, 579-586 (2014).
- 127 Megoulas, N. C. & Koupparis, M. A. Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly

- volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape. *Journal of Chromatography A* **1057**, 125-131 (2004).
- 128 Wanger, A., Mills, K., Nelson, P. W. & Rex, J. H. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 2520-2522 (1995).
- 129 Lai, Y. P., Peng, Y. F., Zuo, Y., Li, J., Huang, J., Wang, L. F. & Wu, Z. R. Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 243-250, doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.143 (2005).
- 130 ISO 20776-1:2006: Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. *ISO 20776-1:2006* (2006).
- 131 Garreta, J. M. I. & Yoncheva, K. P. (US 8628801 B2, 2014).
- 132 Standard, A. in *Am Soc Testing Mater.* 4187-4182.
- 133 Papakostas, D., Rancan, F., Sterry, W., Blume-Peytavi, U. & Vogt, A. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res* **303**, 533-550, doi:10.1007/s00403-011-1163-7 (2011).
- 134 Misra, R., Acharya, S. & Sahoo, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today* **15**, 842-850 (2010).
- 135 Italia, J. L., Bhatt, D. K., Bhardwaj, V., Tikoo, K. & Kumar, M. N. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral. *J Control Release* **119**, 197-206, doi:10.1016/j.jconrel.2007.02.004 (2007).
- 136 Pérez, L., Infante, M., Angelet, M., Clapes, P. & Pinazo, A. Glycerolipid arginine-based surfactants: synthesis and surface active properties. *Trends in Colloid and Interface Science XVI*, 210-216 (2004).
- 137 Cacialli, F., Wilson, J. S., Michels, J. J., Daniel, C., Silva, C., Friend, R. H., Severin, N., Samori, P., Rabe, J. P., O'Connell, M. J., Taylor, P. N. & Anderson, H. L. Cyclodextrin-threaded conjugated polyrotaxanes as insulated molecular wires with reduced interstrand interactions. *Nat Mater* **1**, 160-164, doi:10.1038/nmat750 (2002).

- 138 Farcas, A., Jarroux, N., Harabagiu, V. & Guégan, P. Synthesis and characterization of a poly [2, 7-(9, 9-dioctylfluorene-alt-2, 7-fluorene/ $\beta$ -CD)] main chain polyrotaxane. *European Polymer Journal* **45**, 795-803 (2009).
- 139 Bangham, A. D. & Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol* **8**, 660-668 (1964).
- 140 Traiphol, R., Sanguansat, P., Sriksirin, T., Kerdcharoen, T. & Osotchan, T. Spectroscopic study of photophysical change in collapsed coils of conjugated polymers: effects of solvent and temperature. *Macromolecules* **39**, 1165-1172 (2006).
- 141 Kahveci, Z. Interaction between conjugated polyelectrolites and biological systems: characterization and biotechnological applications. *Tesis Doctoral, IBMC, Universidad Miguel Hernández* (Elche, 2016).
- 142 Lu, L., Rininsland, F. H., Wittenburg, S. K., Achyuthan, K. E., McBranch, D. W. & Whitten, D. G. Biocidal activity of a light-absorbing fluorescent conjugated polyelectrolyte. *Langmuir* **21**, 10154-10159 (2005).
- 143 Lee, S., Cheng, H., Chi, M., Xu, Q., Chen, X., Eom, C. Y., James, T. D., Park, S. & Yoon, J. Sensing and antibacterial activity of imidazolium-based conjugated polydiacetylenes. *Biosens Bioelectron* **77**, 1016-1019, doi:10.1016/j.bios.2015.10.090 (2016).
- 144 Parthasarathy, A., Pappas, H. C., Hill, E. H., Huang, Y., Whitten, D. G. & Schanze, K. S. Conjugated Polyelectrolytes with Imidazolium Solubilizing Groups. Properties and Application to Photodynamic Inactivation of Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**, 28027-28034, doi:10.1021/acsami.5b02771 (2015).
- 145 Sun, H., Yin, B., Ma, H., Yuan, H., Fu, B. & Liu, L. Synthesis of a Novel Quinoline Skeleton Introduced Cationic Polyfluorene Derivative for Multimodal Antimicrobial Application. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**, 25390-25395, doi:10.1021/acsami.5b07890 (2015).
- 146 Ojer, P., Neutsch, L., Gabor, F., Irache, J. M. & Lopez de Cerain, A. Cytotoxicity and cell interaction studies of bioadhesive poly(anhydride) nanoparticles for oral antigen/drug delivery. *J Biomed Nanotechnol* **9**, 1891-1903 (2013).
- 147 Panyam, J., Zhou, W.-Z., Prabha, S., Sahoo, S. K. & Labhasetwar, V. Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *The FASEB Journal* **16**, 1217-1226 (2002).

- 148 Watts, J. L., Clinical & Institute, L. S. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard*. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008).
- 149 Mahapatro, A. & Singh, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of nanobiotechnology* **9**, 55 (2011).
- 150 Gunn, J. & Zhang, M. Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. *Trends in biotechnology* **28**, 189-197 (2010).
- 151 Vasita, R. & Katti, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of nanomedicine* **1**, 15 (2006).
- 152 Guo, G., Fu, S., Zhou, L., Liang, H., Fan, M., Luo, F., Qian, Z. & Wei, Y. Preparation of curcumin loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers and their in vitro antitumor activity against Glioma 9L cells. *Nanoscale* **3**, 3825-3832 (2011).
- 153 Yoo, J. J., Kim, C., Chung, C.-W., Jeong, Y.-I. & Kang, D. H. 5-aminolevulinic acid-incorporated poly (vinyl alcohol) nanofiber-coated metal stent for application in photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine* **7**, 1997-2005 (2012).
- 154 Ma, B., Xie, J., Jiang, J., Shuler, F. D. & Bartlett, D. E. Rational design of nanofiber scaffolds for orthopedic tissue repair and regeneration. *Nanomedicine* **8**, 1459-1481 (2013).
- 155 Eap, S., Keller, L., Schiavi, J., Huck, O., Jacomine, L., Fioretti, F., Gauthier, C., Sebastian, V., Schwinté, P. & Benkirane-Jessel, N. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *International journal of nanomedicine* **10**, 1061 (2015).
- 156 Xie, J., Li, X. & Xia, Y. Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research. *Macromolecular rapid communications* **29**, 1775-1792 (2008).
- 157 Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J. J., Fan, M., Chen, Z. & Jansen, J. A. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical research* **28**, 1259-1272 (2011).
- 158 Zhang, L., Yan, J., Yin, Z., Tang, C., Guo, Y., Li, D., Wei, B., Xu, Y., Gu, Q. & Wang, L. Electrospun vancomycin-loaded coating on titanium implants for the prevention of implant-associated infections. *International journal of nanomedicine* **9**, 3027 (2014).
- 159 Hsu, Y.-H., Chen, D. W.-C., Tai, C.-D., Chou, Y.-C., Liu, S.-J., Ueng, S. W.-N. & Chan, E.-C. Biodegradable drug-eluting nanofiber-enveloped implants for sustained release of high

- bactericidal concentrations of vancomycin and ceftazidime: in vitro and in vivo studies. *International journal of nanomedicine* **9**, 4347 (2014).
- 160 Amna, T., Hassan, M. S., Nam, K.-T., Bing, Y. Y., Barakat, N. A., Khil, M.-S. & Kim, H. Y. Preparation, characterization, and cytotoxicity of CPT/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-embedded PLGA ultrafine composite fibers: A synergistic approach to develop promising anticancer material. *International journal of nanomedicine* **7**, 1659 (2012).
- 161 Yang, R. & Gleason, K. K. Ultrathin antifouling coatings with stable surface zwitterionic functionality by initiated chemical vapor deposition (iCVD). *Langmuir* **28**, 12266-12274 (2012).
- 162 Hsu, S.-h., Huang, S., Wang, Y.-C. & Kuo, Y.-C. Novel nanostructured biodegradable polymer matrices fabricated by phase separation techniques for tissue regeneration. *Acta biomaterialia* **9**, 6915-6927 (2013).
- 163 Weitz, R., Harnau, L., Rauschenbach, S., Burghard, M. & Kern, K. Polymer nanofibers via nozzle-free centrifugal spinning. *Nano letters* **8**, 1187-1191 (2008).
- 164 Hartgerink, J. D., Beniash, E. & Stupp, S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science* **294**, 1684-1688 (2001).
- 165 Yoo, H. S., Kim, T. G. & Park, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **61**, 1033-1042 (2009).
- 166 Krogstad, E. A. & Woodrow, K. A. Manufacturing scale-up of electrospun poly (vinyl alcohol) fibers containing tenofovir for vaginal drug delivery. *International journal of pharmaceuticals* **475**, 282-291 (2014).
- 167 Babitha, S., Rachita, L., Karthikeyan, K., Shoba, E., Janani, I., Poornima, B. & Sai, K. P. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International journal of pharmaceuticals* **523**, 52-90 (2017).
- 168 Doshi, J. & Reneker, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of electrostatics* **35**, 151-160 (1995).
- 169 Tserki, V., Philippou, J. & Panayiotou, C. Preparation and characterization of electrospun poly (butylene succinate-co-butylene adipate) nanofibrous nonwoven mats. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanoengineering and Nanosystems* **220**, 71-79 (2006).
- 170 Shin, Y., Hohman, M., Brenner, M. & Rutledge, G. Experimental characterization of electrospinning: the

- electrically forced jet and instabilities. *Polymer* **42**, 09955-09967 (2001).
- 171 Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., Greiner, A. & Wendorff, J. H. Nanostructured fibers via electrospinning. *Advanced Materials* **13**, 70-72 (2001).
- 172 Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances* **28**, 325-347 (2010).
- 173 Wang, Z.-G., Wan, L.-S., Liu, Z.-M., Huang, X.-J. & Xu, Z.-K. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **56**, 189-195 (2009).
- 174 Burger, C., Hsiao, B. S. & Chu, B. Nanofibrous materials and their applications. *Annu. Rev. Mater. Res.* **36**, 333-368 (2006).
- 175 Marín Márquez, P. & Martínez Tapias, P. Diseño y estudio de una máquina de electrospinning. *Escuela de Ingeniería de Barcelona-E.T. Industrial, especialidad en Química Industrial*. (Barcelona, 2009).
- 176 Frenot, A. & Chronakis, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current opinion in colloid & interface science* **8**, 64-75 (2003).
- 177 Kohn, J. & Langer, R. Bioresorbable and bioresorbable materials. . *New York, Biomaterials Science, Academic Press, B. Ratner* **64-72** (1994).
- 178 Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology* **63**, 2223-2253 (2003).
- 179 Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ramakrishna, S. & Ma, Z. An introduction to electrospinning and nanofibers. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* (Singapore, 2005).
- 180 Sill, T. J. & von Recum, H. A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **29**, 1989-2006 (2008).
- 181 Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. & Tan, N. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* **42**, 261-272 (2001).
- 182 Sencadas, V., Correia, D. M., Areias, A., Botelho, G., Fonseca, A., Neves, I., Ribelles, J. G. & Mendez, S. L. Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydrate Polymers* **87**, 1295-1301 (2012).
- 183 Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E. & Erman, B. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer* **43**, 3303-3309 (2002).

- 184 Lee, J. S., Choi, K. H., Ghim, H. D., Kim, S. S., Chun, D. H., Kim, H. Y. & Lyoo, W. S. Role of molecular weight of atactic poly (vinyl alcohol)(PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* **93**, 1638-1646 (2004).
- 185 Megelski, S., Stephens, J. S., Chase, D. B. & Rabolt, J. F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules* **35**, 8456-8466 (2002).
- 186 Buchko, C. J., Chen, L. C., Shen, Y. & Martin, D. C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* **40**, 7397-7407 (1999).
- 187 Haghi, A. & Akbari, M. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica status solidi (a)* **204**, 1830-1834 (2007).
- 188 Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C. & Sheng, J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International* **53**, 1704-1710 (2004).
- 189 Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S. & Chu, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* **43**, 4403-4412 (2002).
- 190 Ribeiro, C., Sencadas, V., Ribelles, J. L. G. & Lanceros-Méndez, S. Influence of processing conditions on polymorphism and nanofiber morphology of electroactive poly (vinylidene fluoride) electrospun membranes. *Soft Materials* **8**, 274-287 (2010).
- 191 Teo, W. E. & Ramakrishna, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* **17**, R89 (2006).
- 192 Li, D., Wang, Y. & Xia, Y. Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano letters* **3**, 1167-1171 (2003).
- 193 Ki, C. S., Baek, D. H., Gang, K. D., Lee, K. H., Um, I. C. & Park, Y. H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer* **46**, 5094-5102 (2005).
- 194 Kang, H., Zhu, Y., Jing, Y., Yang, X. & Li, C. Fabrication and electrochemical property of Ag-doped SiO<sub>2</sub> nanostructured ribbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **356**, 120-125 (2010).
- 195 Casper, C. L., Stephens, J. S., Tassi, N. G., Chase, D. B. & Rabolt, J. F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* **37**, 573-578 (2004).
- 196 Hayashi, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in polymer science* **19**, 663-702 (1994).

- 197 Bunke, A., Zerbe, O., Schmid, H., Burmeister, G., Merkle, H. & Gander, B. Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *Journal of pharmaceutical sciences* **89**, 1335-1341 (2000).
- 198 Buchko, C. J., Kozloff, K. M. & Martin, D. C. Surface characterization of porous, biocompatible protein polymer thin films. *Biomaterials* **22**, 1289-1300 (2001).
- 199 Liao, T. & Adanur, S. Computerized failure analysis of nonwoven fabrics based on fiber failure criterion. *Textile research journal* **69**, 489-496 (1999).
- 200 Laurencin, C. T., Ambrosio, A., Borden, M. & Cooper Jr, J. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual review of biomedical engineering* **1**, 19-46 (1999).
- 201 Buschle-Diller, G., Cooper, J., Xie, Z., Wu, Y., Waldrup, J. & Ren, X. Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose* **14**, 553-562 (2007).
- 202 Agrawal, C. & Ray, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of biomedical materials research* **55**, 141-150 (2001).
- 203 Jain, R., Shah, N. H., Malick, A. W. & Rhodes, C. T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug development and industrial pharmacy* **24**, 703-727 (1998).
- 204 Imaz, I., Hernando, J., Ruiz-Molina, D. & Maspoch, D. Metal-organic spheres as functional systems for guest encapsulation. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 2325-2329 (2009).
- 205 Usero, R. & Suárez, N. Electrospinning de poliesteramidas biodegradables. *PFC, Ingeniería Técnica Química, EUETIB, UPC*, 21-22 (2009).
- 206 Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. Ed; Elsevier Health Sciences (New York, 2015).
- 207 cosmetics, G. <http://cosmeticosnaturales.galeon.com>.
- 208 Franz, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology* **64**, 190-195 (1975).
- 209 Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A. & Kessel, D. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 250-281 (2011).
- 210 Baldea, I. & Filip, A. Photodynamic therapy in melanoma—an update. *Journal of physiology and pharmacology* **63**, 109-118 (2012).



- 211 Kim, C. H., Chung, C.-W., Choi, K. H., Yoo, J.-J., Kim, D. H., Jeong, Y.-I. & Kang, D. H. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *International journal of nanomedicine* **6**, 1357 (2011).
- 212 Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C. & Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* **61**, 250-281, doi:10.3322/caac.20114 (2011).
- 213 Arroyo, A. Investigación en coprología. *Reunión Investigación biomédica HGUE-IBMC* (2016).
- 214 Johnson, R. P., Chung, C.-W., Jeong, Y.-I., Kang, D. H., Suh, H. & Kim, I. Poly (L-histidine)-tagged 5-aminolevulinic acid prodrugs: new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX for photodynamic colon cancer therapy. *Int J Nanomedicine* **7**, 2497-2512 (2012).
- 215 Shi, L., Wang, X., Zhao, F., Luan, H., Tu, Q., Huang, Z., Wang, H. & Wang, H. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *International journal of nanomedicine* **8**, 2669 (2013).
- 216 Gomez, A. Desarrollo y optimización de nanofibras de PMVEMA-H mediante electrospinning. *Proyecto final de carrera, IBMC, Universidad Miguel Hernández* (Elche, 2014).
- 217 Brown, C. K., Friedel, H. D., Barker, A. R., Buhse, L. F., Keitel, S., Cecil, T. L., Kraemer, J., Morris, J. M., Reppas, C. & Stickelmeyer, M. P. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. (India, 2011).
- 218 FDA Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale - Up and Post Approval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In vitro Release Testing and In vivo Bioequivalence Documentation. (1997).
- 219 No, O. T. 428: skin absorption: in vitro method. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4* (2004).
- 220 Armoškaitė, V., Jakštas, V., Ivanauskas, L., Ražukas, A., Ramanauskienė, K. & Briedis, V. Application of HPLC-ELSD for the Quantification of 5-Aminolevulinic Acid after Penetration into Human Skin Ex Vivo. *Analytical Letters* **46**, 717-733 (2013).
- 221 Miller, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. (Pearson Education, 2005).
- 222 Vázquez-Guilló, R., Calero, A., Valente, A. J., Burrows, H. D., Mateo, C. R. & Mallavia, R. Novel electrospun luminescent

- nanofibers from cationic polyfluorene/cellulose acetate blend. *Cellulose* **20**, 169-177 (2013).
- 223 Kuo, C. C., Wang, C. T. & Chen, W. C. Highly-Aligned Electrospun Luminescent Nanofibers Prepared from Polyfluorene/PMMA Blends: Fabrication, Morphology, Photophysical Properties and Sensory Applications. *Macromolecular Materials and Engineering* **293**, 999-1008 (2008).
- 224 <https://www.sigmaaldrich.com>.
- 225 Herrera, A., Martínez, R. & M., S. Métodos espectroscópicos en Química Orgánica. *Editorial Síntesis, S.A.*, 29-70 (Madrid, 1997).
- 226 Ma, W., Iyer, P. K., Gong, X., Liu, B., Moses, D., Bazan, G. C. & Heeger, A. J. Water/Methanol-Soluble Conjugated Copolymer as an Electron-Transport Layer in Polymer Light-Emitting Diodes. *Advanced Materials* **17**, 274-277 (2005).
- 227 Gay, S., Martoccia, C., Zellweger, M., Wang, Q. & Wagnières, G. Study of the stability of the 5-aminolevulinic acid tyrosine ester in aqueous solution. *ARKIVOC* **3**, 228-238 (2014).
- 228 Tena, A., Shishatskiy, S. & Filiz, V. Poly (ether–amide) vs. poly (ether–imide) copolymers for post-combustion membrane separation processes. *RSC Advances* **5**, 22310-22318 (2015).
- 229 Singhvi, G. & Singh, M. Review: in-vitro drug release characterization models. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2**, 77-84 (2011).
- 230 Tamaddon, L., Mostafavi, S. A., Karkhane, R., Riazi-Esfahani, M., Dorkoosh, F. A. & Rafiee-Tehrani, M. Design and development of intraocular polymeric implant systems for long-term controlled-release of clindamycin phosphate for toxoplasmic retinochoroiditis. *Advanced biomedical research* **4**, 32 (2015).
- 231 Li, S., Shen, Y., Li, W. & Hao, X. A common profile for polymer-based controlled releases and its logical interpretation to general release process. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **9**, 238-244 (2006).
- 232 Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of pharmaceutical sciences* **52**, 1145-1149 (1963).
- 233 Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. & Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceutics* **15**, 25-35 (1983).
- 234 Ritger, P. L. & Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from

- swellable devices. *Journal of controlled release* **5**, 37-42 (1987).
- 235 Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. & Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **67**, 217-223 (2010).







