



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

NANOFIBRAS POLIMÉRICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE TAURINA

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2024

Autor: Paula del Carmen Sánchez García

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Ricardo Mallavia Marín, Amalia Mira Carrió

Resumen:

Cada vez es más común el uso de la técnica de electrohilado para la creación de nanofibras donde se pueden encapsular metabolitos para investigar sus propiedades y funciones. Al fabricar nanofibras aumenta la superficie de absorción que presenta el fármaco y, por tanto, su absorción. Con este trabajo de fin de grado se busca encapsular taurina mediante nanofibras usando PMVEMA-Ac [poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico)] y PMVEMA-Es [poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster)].

Para poder electrohilar una sustancia ha de ser lo suficientemente viscosa, entre 100 y 2000 cP, es por ello por lo que primero se midió la viscosidad de las disoluciones poliméricas para comprobar que efectivamente se podían electrohilar.

Mediante la microscopía óptica y electrónica (FESEM) se realizó una caracterización cualitativa de la morfología de las nanofibras, resultando en fibras homogéneas con PMVEMA-Ac y fibras heterogéneas con el PMVEMA-Es. Los diámetros de estas fueron 318 ± 17 nm para las de PMVEMA-Ac y de 456 ± 180 nm para PMVEMA-Es.

De forma cualitativa se utilizó la espectroscopía infrarroja donde se observó que se había conseguido encapsular taurina dentro de las nanofibras, así que posteriormente se cuantificaron estos resultados con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Por último, se realizó un ensayo *in vitro* para observar la degradación de las nanofibras y la liberación de taurina a diferentes pH y diferentes tiempos. Posteriormente se cuantificó mediante HPLC para ver la cantidad de metabolito que se liberaba en función del tiempo.

Palabras clave: taurina, PMVEMA, viscosidad, nanofibras, *electrospinning*, microscopía, FESEM, infrarrojo, HPLC, degradación pH.

Abstract:

The use of the electrospinning technique for the creation of nanofibers where metabolites can be encapsulated to investigate their properties and functions is increasingly common. By manufacturing nanofibers, the absorption surface of the drug increases and, therefore, its absorption. This final degree project seeks to encapsulate taurine through nanofibers using PMVEMA-Ac [poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid)] and PMVEMA-Es [poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester)].

To be able to electrospin a substance it must be sufficiently viscous, between 100 and 2000 cP, which is why the viscosity of the polymer solutions was first measured to verify that they could indeed be electrospinned.

Using optical and electron microscopy (FESEM), a qualitative characterization of the morphology of the nanofibers was carried out, resulting in homogeneous fibers with PMVEMA-Ac and heterogeneous fibers with PMVEMA-Es. Their diameters were 318 ± 17 nm for PMVEMA-Ac and 456 ± 180 nm for PMVEMA-Es.

Another qualitative technique that was used was infrared spectroscopy where it was observed that taurine had been encapsulated within the nanofibers, so these results were subsequently quantified with the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique.

Finally, an in vitro test was carried out to observe the degradation of the nanofibers and the release of taurine at different pH and different times. It was subsequently quantified using HPLC to see the amount of metabolite that was released as a function of time.

Key words: taurine, PMVEMA, viscosity, nanofibers, electrospinning, microscopy, FESEM, infrared, HPLC, pH degradation.

ÍNDICE

Resumen:	2
Abstract:	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Vías de administración de fármacos	6
1.2 Importancia de los polímeros y las nanofibras	7
1.3 Elaboración de nanofibras por electrohilado (electrospinning)	7
1.4 Propiedades de los polímeros	9
1.4.1 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) solution	9
1.4.2 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid).....	10
1.5 Taurina	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo General	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 Reactivos	13
3.2 Disoluciones Poliméricas	13
3.3 Elaboración de nanofibras	15
3.4 Caracterización morfológica de las nanofibras	15
3.4.1 Viscosidad	15
3.4.2 Microscopía óptica y electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	17
3.5 Caracterización cualitativa de la taurina	17
3.5.1 Espectroscopía Infrarroja	17
3.6 Caracterización cuantitativa de la taurina	18
3.6.1 High-performance liquid chromatography (HPLC).....	18
3.7 Ensayo in-vitro: Estudio de degradación de fibras con diferentes pH	19

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 Determinación de la viscosidad de la disolución de Taurina.....	21
4.2 Preparación de las nanofibras de Taurina.....	23
4.3 Caracterización de la morfología de las nanofibras de Taurina.....	23
4.3.1 Caracterización por microscopía óptica.....	23
4.3.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	25
4.4 Evaluación cualitativa mediante Infrarrojo.....	29
4.5 Evaluación cuantitativa: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	30
4.6 Estudio de degradación con diferentes pH.....	32
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías de administración de fármacos

La vía oral es la vía más usada por su comodidad, seguridad y por ser una de las vías más económicas. Aun así, a la hora de experimentar con esta hay que tener en cuenta la biodisponibilidad, la tolerancia gástrica, las interacciones entre los distintos fármacos administrados simultáneamente o los alimentos que puedan ser peligrosos para el tratamiento, además de los efectos adversos que los compuestos puedan ocasionar para así poder proporcionar la máxima seguridad posible. También es importante tener en cuenta el intervalo posológico en el que va a administrarse el fármaco y si debe respetarse de forma estricta o no ⁽¹⁾

Otro enfoque podría ser la vacunación oral en el caso de no conseguir una buena eficacia por las vías de vacunación más comunes (como la parenteral) ⁽²⁾ La vacunación es muy eficaz en los tratamientos preventivos y el control de enfermedades y aunque la vía parenteral es ideal para situaciones agudas en las que se precisa rapidez puede producir embolias o infecciones. ⁽³⁾

Hay otras vías que también son muy importantes, como la vía sublingual en la que el fármaco se absorbe por la mucosa sublingual y accede a la circulación por la vena cava pasando por la aurícula derecha evitando así el paso hepático e intestinal, lo que es muy útil en situaciones agudas en las que se necesita rapidez. ⁽³⁾

La vía rectal, por otro lado, pierde el factor de comodidad de la vía oral y puede presentar una absorción más lenta e incompleta ⁽³⁾ pero en cambio evita el paso por el intestino por lo que es perfecto para fármacos que producen irritación gastrointestinal, así como aquellos que son afectados por el pH ácido del estómago o por sus enzimas digestivas.

Otra opción sería mediante cremas y pomadas por vía dérmica que se usan sobre todo en tratamientos locales de afecciones de la piel o los músculos, pero de forma más superficial ya que si la afección se encuentra muy profunda será mejor llegar por otras vías.

Por último, entre otras muchas vías, encontramos la vía inhalatoria que se utiliza principalmente para fármacos que actúan en las vías respiratorias de forma local. (3)

1.2 Importancia de los polímeros y las nanofibras

Los avances científicos son cada día más relevantes en cuanto a la administración de medicamentos. Actualmente se buscan nuevas herramientas que ayuden a aumentar la efectividad o mejorar el efecto de los fármacos debido a la falta de aparición de nuevos antibióticos y para ello nos apoyamos en la biotecnología. Nuevas herramientas como la encapsulación de fármacos dentro de nanopartículas, conocido también como nanoencapsulación puede proteger al fármaco de su degradación aumentando su eficiencia y alargando su vida media, además de, presentar una administración más fácil y dirigida y una cinética de liberación controlada. (4)

Asimismo, el constante desarrollo de nuevos polímeros biocompatibles contribuye a la potenciación de dichas nanoestructuras dado que permiten el uso de compuestos con limitaciones de solubilidad. Más aún, las nanoestructuras que se forman presentan propiedades adaptadas a las aplicaciones de forma muy específica, esto es debido a la manipulación de los protocolos de síntesis y sus capas, como ejemplo podría ser el uso de nanopartículas para inyectables o vendajes de heridas. (4)

1.3 Elaboración de nanofibras por electrohilado (electrospinning)

En 1934 fue patentada por Formhals la técnica del electrospinning o electrohilado (5) que es un método moderno y eficiente que usa el campo eléctrico para una producción de fibras finas con las que se puede elaborar unas estructuras porosas versátiles que se organizan por unidades de nanofibras (6) Es un método fácil, adaptable, sencillo, económico, con mucha efectividad y fácil implantación, que además proporciona la posibilidad de escalado a nivel industrial. (7)

El electrospinning nos permite conseguir fibras de diferentes diámetros, longitudes, tamaños y densidades de poros. Para poder conseguir un buen control de las características morfológicas de las fibras hay que ajustar tanto los parámetros de la disolución polimérica que se ha empleado como los de las condiciones experimentales. ⁽⁸⁾

Entre las características de la disolución polimérica hay que destacar por parte del polímero la distribución del peso molecular y el grado de dispersión, mientras que en el disolvente es muy importante su volatilidad. Además, hay que tener en cuenta la concentración empleada y cómo hace variar la viscosidad o la tensión superficial. ⁽⁸⁾

En el proceso de electrohilado (Figura 1), la disolución polimérica atraviesa la aguja de electrospinning (B) y a causa de la tensión superficial a la que se somete forma una gota en el extremo de la aguja en forma de triángulo conocida como el “cono de Taylor”, nombre que proviene por el científico que la descubrió en 1969 ⁽⁹⁾. Este cono emite un chorro denominado “jet” que se dirige al colector (portaobjetos) donde las fibras que se forman a lo largo del jet se van depositando. Este Jet acaba solidificando y creando una fibra nanométrica.

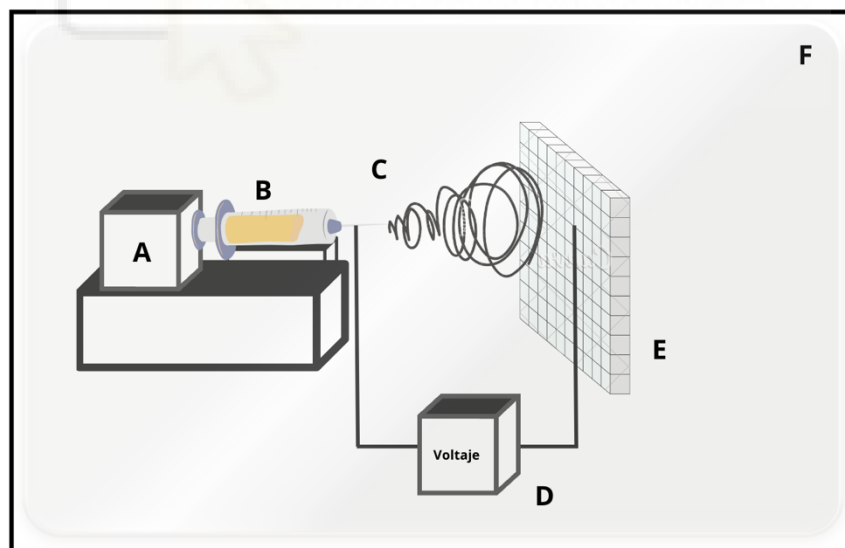


Figura 1: Equipo de electrospinning.

A. Bomba impulsora **B.** Jeringa cargada con solución. **C.** Aguja donde se forma el cono de Taylor. **D.** Equipo de voltaje **E.** Colector. **F.** Campana de protección.

Las variables que se necesitan medir para poder leer de forma correcta los resultados son tanto las del equipo de electrospinning como las medioambientales ya que estas pueden afectar en las fibras y que no se consigan nanofibras poliméricas homogéneas si no que se formen imperfecciones, como gotas, dentro de las fibras. Estas variables se pueden clasificar en 3 grupos ⁽¹⁰⁾

1. Propiedades de disolución, como la viscosidad, la concentración del polímero o la tensión superficial.
2. Variables del equipo, como la velocidad del flujo, la potencia eléctrica, la distancia entre la aguja y el receptor y el tipo de colector.
3. Parámetros ambientales, como la humedad relativa de la cámara, la temperatura y la velocidad del aire de la cámara.

1.4 Propiedades de los polímeros

Los experimentos de este Trabajo de Fin de Grado se han llevado a cabo usando dos materiales poliméricos biocompatibles llamados poli (metil vinyl éter-alt-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-Es) y poli (metil vinyl éter-alt-ácido maleico) (PMVEMA-Ac)

1.4.1 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) solution

El Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) solución, también conocido como PMVEMA-Es (figura 2), es un derivado éster del PMVEMA ⁽¹⁰⁾ que se obtiene cuando se produce una reacción entre el PMVEMA anhídrido y un alcohol.

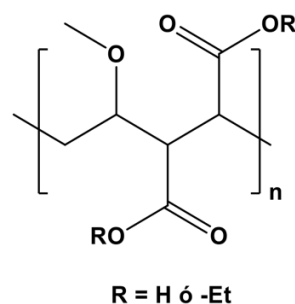


Figura 2: Estructura del PMVEMA-Es

1.4.2 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid)

Por otra parte, tenemos el Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) conocido como PMVEMA-Ac (figura 3), se obtiene cuando el anhídrido reacciona con el agua. Este polímero se presenta en forma de polvo, es hidrófilo y biocompatible con propiedades bioadhesivas. Es un polímero ácido que se puede utilizar para mejorar la estabilidad (11). Se disuelve fácilmente en agua y cationes alcalinotérreos, pero no en iones de metales pesados tóxicos.

El PMVEMA-Ac es la molécula de ácido libre de la forma anhidra (PMVEMA). Las soluciones acuosas del PMVEMA-Ac que no hayan pasado por un proceso de neutralización presentarán una viscosidad creciente que mejorará la formación de nanoestructuras (10).

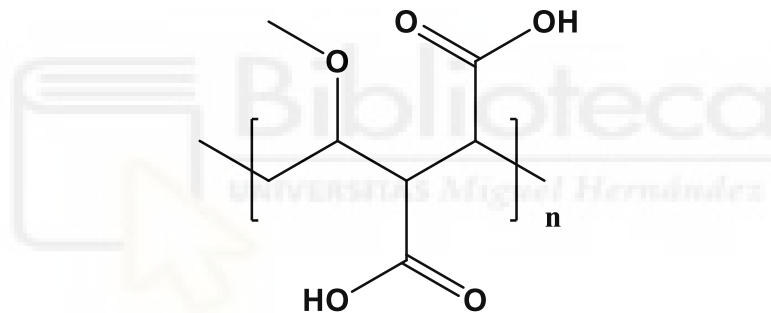


Figura 3: Estructura del PMVEMA-Ac

1.5 Taurina

La Taurina es un compuesto bastante soluble en agua (12) que se sintetiza en las células a partir del aminoácido metionina a través de una ruta metabólica de moléculas azufradas donde ocurren reacciones de oxidación y descarboxilación (Figura 4).

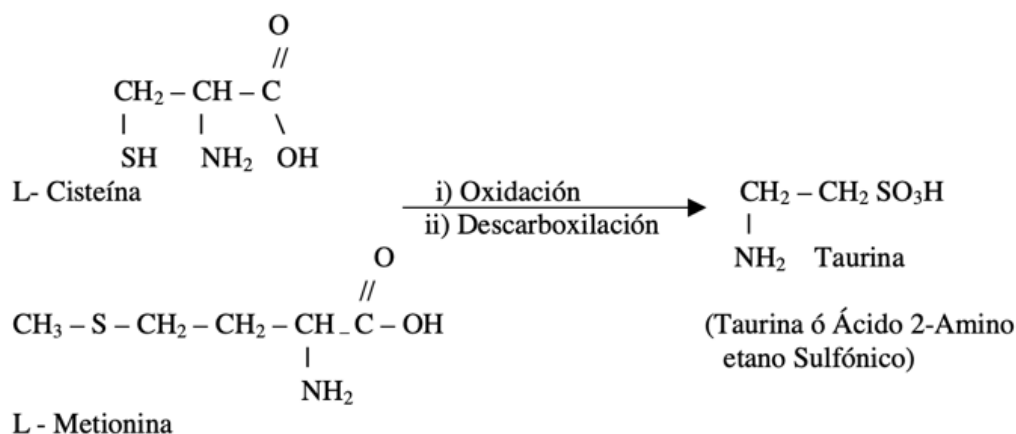


Figura 4: Biosíntesis de la taurina (13)

Actualmente, la taurina es muy utilizada para incrementar energía, e incluso, en patologías como la hipertensión, diabetes mellitus y en fallo cardíaco (14). Además de las mencionadas posibles acciones, la taurina tiene un potente efecto antioxidante y osmoregulador (15). Esta capacidad antioxidante se debe al hecho de que la taurina forma cloroaminas estables en granulocitos y neutrófilos gracias a hipocloritos, potentes agentes antioxidantes, generados en el organismo (16). En estos casos la taurina puede ser asimismo clorinada a partir de la reacción de la enzima mieloperoxidasa, producida al reaccionar agua oxigenada (H₂O₂) con cloruro (Cl⁻) (17). Todas estas reacciones señalan la importante capacidad de la taurina para atrapar moléculas que puedan causar daño celular (14).

Dada la distribución que presenta la taurina en distintas especies tanto vegetales como animales esta se encuentra más en dietas omnívoras que en las vegetarianas. Según el estudio *The taurine content common foodstuffs* de S.A. Laidlaw, M. Grosvenor y J.D. Kopple la taurina se encuentra mayoritariamente en carnes rojas, pescados, mariscos y leche humana (18). Por tanto, teniendo en cuenta el elevado valor biológico y antioxidante de la taurina, los vegetarianos y veganos podrían estar expuestos a una carga inferior con menor capacidad de reacción frente diferentes situaciones, como puede ser los agentes oxidantes (14).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo fin de grado es la elaboración de nanofibras biopoliméricas encapsulando taurina. Este es llevado a cabo mediante un escalado de puntos intermedios para finalmente obtener unas nanofibras lo más adecuadas posibles para poder introducir las bien en alimentos para posterior liberación o bien pudiesen ser implantadas a nivel local en un órgano.

2.2 Objetivos Específicos

Los pasos para llegar al objetivo final se dividen en:

2.2.1. Elaboración de disoluciones poliméricas.

2.2.2. Determinación de las características fisicoquímicas de las nanofibras utilizando diferentes técnicas:

- Microscopía óptica: para determinar la forma y ver posibles imperfecciones
- Microscopía electrónica (FESEM): con la que determinamos la homogeneidad y tamaño.

2.2.3. Determinación cualitativa

- Infrarrojos: para determinar de forma cualitativa e identificar la taurina en las fibras.

2.2.4. Determinación cuantitativa de las fibras por HPLC

2.2.5 Ensayos *in vitro*: degradación de las fibras a diferentes pH. Con ellos se estudiará los tiempos de degradación de las fibras y se analizará la cantidad de liberación de taurina en función del tiempo en los diferentes pH.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

→ Metabolito utilizado Taurina ($C_2H_7NO_3S$) con una pureza $\geq 99.5\%$ y peso molecular de 125,15 g/mol (Sigma-Aldrich) con una solubilidad en agua de 0.5 M o lo que es lo mismo 62,575 g/L.

→ Polímeros. Se empleó PMVEMA-Ac (Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) de Mw (216,000 g/mol) (Sigma-Aldrich) y PEVEMA-Es (Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) con un Mw de 130,000 g/mol y a un 50% en etanol.

→ Disolventes: Agua miliQ, procedente del dispositivo Mili-Q Q-Pod (Sigma-Aldrich), etanol for spectroscopy de pm 46.07 (Supelco – Sigma-Aldrich) y etanol de 32,04 g/mol Chromasolv Gradient for HPLC (Sigma-Aldrich) con una pureza del $\geq 99.9\%$.

→ Tampones: Tampón de solución pH 10,00 \pm 0,05 (20°C) (color azul) ST tampón de solución pH 10,00 \pm 0,05 (20°C) (coloreada de azul) ST, tampón de solución pH 7,00 \pm 0,05 (20°C) (coloreada de amarillo) ST y tampón de solución pH 4,00 \pm (20°C) (coloreada de rojo) ST (Panreac Química S.L.U, Castellar del Vallès, Barcelona, España).

3.2 Disoluciones Poliméricas

Inicialmente, se prepararon diferentes disoluciones poliméricas de blancos, es decir sin metabolitos activos. Una de ellas fue la mezcla de PMVEMA-Ac al 20% p/p en agua y otra la de PMVEMA-Es al 25% en etanol.

A continuación, se procedió a incorporar el metabolito en diferentes concentraciones a las disoluciones poliméricas (blanco) con el fin de determinar hasta qué punto era soluble y podía introducirse en las mismas. Los porcentajes que se pudieron lograr fueron al 1%, 5% y 10% de Taurina p/p respecto de la cantidad de polímero sólido. Para ello, se utilizaron 3 viales de muestra rotulados con 10 ml de disolución en cada uno de ellos. En los viales se midieron 2000 mg de PMVEMA-Ac y la cantidad correspondiente de agua. Una vez preparadas, se dejan los viales en agitación

durante una hora y una vez finalizado este tiempo se sonicaron un período de 10 minutos para evitar las burbujas que posteriormente pueden alterar la correcta formación de nanofibras. Posteriormente, se pesó la cantidad necesaria de taurina para cada concentración, se añaden en los viales correspondientes y se dejaron en agitación mínimo un día para conseguir una disolución homogénea y, finalmente, sonicar.

Otra prueba que se realizó fue solubilidad de la taurina en etanol usando la menor concentración de taurina (1%). Para ello se mezclaron en un vial 2,5 mg de taurina y 1ml de etanol.

Por último, preparamos una disolución al 25% p/p de PMVEMA-Es. Como la Taurina no es soluble en etanol para poder llevar a cabo estas disoluciones se realizaron dos disoluciones por separado para posteriormente unir las. Por una parte, se realizó la mezcla de PMVEMA-Es y etanol y, por otro lado, la mezcla de polímero y agua y así, se mezclaron finalmente.

De esta forma lo primero que se hizo fue crear una disolución stock de PMVEMA-Es y etanol al 25% p/p, ya que la comercial es al 50% p/p en etanol. Para crearla se utilizó 7,5 g de PMVEMA-Es y 7,5 g de etanol, bajando así la concentración a la mitad y se dejó en agitación durante 1 hora. Además, se preparó una disolución de 3 ml de agua y 15 mg de taurina para crear una disolución al 1%. Una vez se disolvieron las dos mezclas, por separado, se unieron y se dejaron en agitación durante un día entero con una sonicación de 10 minutos posterior.

De esta forma quedaron las siguientes 6 soluciones finales.

- 1) PMVEMA-Ac 20 % p/p.
- 2) PMVEMA-Ac 20 % p/p + TAU 1% p/p.
- 3) PMVEMA-Ac 20 % p/p + TAU 5% p/p.
- 4) PMVEMA-Ac 20 % p/p + TAU 10% p/p.
- 5) PMVEMA-Es 25 % p/p
- 6) PMVEMA-Es 25 % p/p + TAU 1% p/p.

Todas estas disoluciones se prepararon y conservaron a temperatura ambiente (25 ± 5 °C) tapándolas con papel de aluminio debido a que son fotosensibles y no necesitan menores temperaturas (¹⁹)

Se eligieron estas concentraciones para poder observar un rango significativo de las concentraciones de taurina entre una muy poco concentrada (1%), una muy concentrada (10%) y una intermedia (5%).

3.3 Elaboración de nanofibras

Para preparar las nanofibras se usó la técnica de electrohilado como se comenta en el apartado de introducción. Las soluciones se introdujeron en jeringas de 2 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) junto a una aguja de acero inoxidable 316, calibre 1,2 mm y punta roma con un ángulo de 90° (Sigma Aldrich). Para nuestro electrohilado usamos un equipo protegido por una caja de metacrilato que debe permanecer cerrada en todo el proceso de uso y que consta de una bomba de infusión KDScientific-100-CE (KD Scientific, Holliston, MA, Estados Unidos) que controla que haya un flujo constante y una fuente de alto voltaje Glassman High Voltage FC60P2 (Glassman High Voltage Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, Estados Unidos).

3.4 Caracterización morfológica de las nanofibras

3.4.1 Viscosidad

Ante la necesidad de comprobar si las muestras eran lo suficientemente viscosas para llegar a electrohilarse, entre 100 y 2000 cP (²⁰), medimos su viscosidad con un viscosímetro capilar Vidra Foc de 500 mL y 350 mL (Barcelona, España). Se midió el tiempo que tardaba en pasar nuestra disolución entre las 2 marcas del tubo, se calculó la densidad, y con una constante proporcionada por el fabricante para dicho viscosímetro se obtuvo la viscosidad en centipoise (cP). En nuestro caso usamos el viscosímetro de 500 para las soluciones con PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es y el de 350 para las de PMVEMA-Es.

La forma en la que funciona un viscosímetro de Ostwald es la siguiente:

Primero se vierte la solución por el orificio más grande (1) y se llena el (B) hasta que el polímero llegue más o menos a la línea A. A continuación, se coge una propipeta de succión, se aprieta la zona D y se coloca en el orificio más pequeño (2), una vez situado se empieza a succionar presionando la zona E de la propipeta y se lleva a la solución por encima de la línea C, una vez ha llegado a este punto se corta la succión y se cronometra el tiempo que tarda en llegar de la línea C a la D. Este último paso de cronometraje se debe realizar un mínimo de 3 veces.

El volumen de viscosímetro utilizado dependerá de la viscosidad que tenga la solución, como no hay ninguna medida preestablecida para saber que viscosímetro se podrá usar el único método es el científico, prueba y error. El tiempo óptimo de duración es no menos de 2 minutos y no más de media hora.

Una vez medidos los tiempos se usará la ecuación de la viscosidad [$\mu = t(s) \cdot k \cdot \text{Densidad}$] siendo k la constante que varía según el viscosímetro (k= 8,2230 para el viscosímetro de 500 ml; k= 0,4956 para el viscosímetro de 350 ml, según certificado de fábrica)

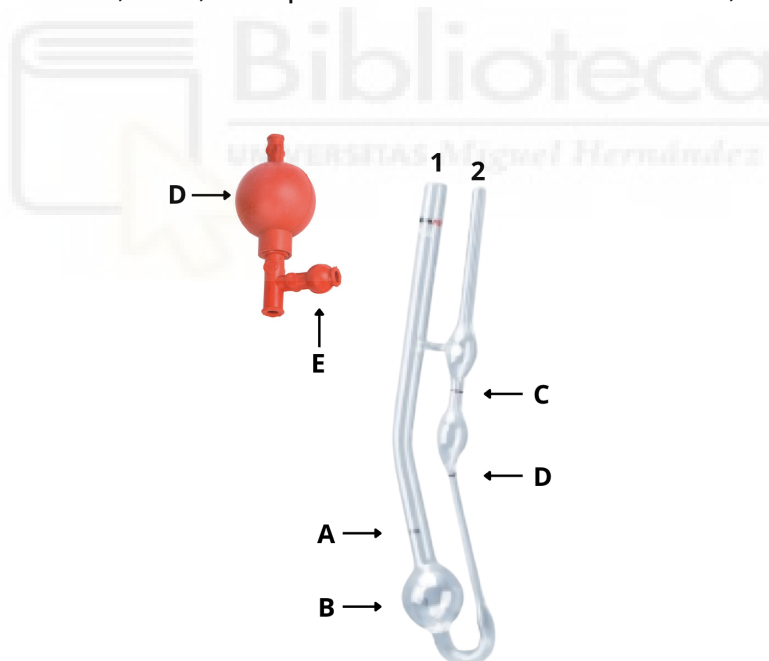


Figura 5: Propipeta y Viscosímetro

3.4.2 Microscopía óptica y electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Una vez obtenidas las fibras mediante el electrohilado se analizaron las características morfológicas de las mismas (diámetro y uniformidad) mediante el microscopio óptico MycosystemsDMI3000B (Leica, Bensheim, Alemania) con una fuente de luz LEICA EL6000 y una cámara digital Leica DFC 3000G. Las imágenes se analizaron con el programa del propio microscopio Leica Application Suite AF 6000 Module Systems.

Para poder obtener una caracterización más precisa se usó la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) con un aparato Schottky de emisión de campo de cátodo caliente modelo SIGMA 300 VP (Oberkochen, Alemania). Para analizar estas muestras se empleó el programa ImageJ en el cual se hicieron 100 medidas de cada muestra para hacer una media de diámetros de las diferentes nanofibras. Con estos datos se usó el programa GraphPad Prism 8 para hacer un histograma comparativo.

3.5 Caracterización cualitativa de la taurina

3.5.1 Espectroscopía Infrarroja

La mayoría de las moléculas absorben parte de la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético y la convierten en una vibración molecular. Esta absorción es diferente según el enlace químico que se forma, y esto es lo que nos permite diferenciar en una muestra los diferentes tipos de moléculas que presenta.

En nuestro caso usamos un espectrómetro de infrarrojo Spectrum Two™ (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para poder determinar la presencia de taurina en las nanofibras de PMVEMA-Ac (se usó Tau 10%) y PMVEMA-Es (se usó Tau 1%) Para utilizar este equipo y realizar el espectro de infrarrojo se crearon pastillas usando parte de las nanofibras junto al bromuro de potasio (KBr) (Sigma-Aldrich).

Para ello seguimos el siguiente procedimiento:

- 1) En un mortero de ágata se añadió KBr y parte de nuestras nanofibras para homogeneizarlos juntos y disminuir el tamaño de las partículas.
- 2) La mezcla de polvo conseguida se introdujo en un molde de 13 mm (SPECAC, Cray Ave, Orpington, Reino Unido).
- 3) Este molde se coloca en una prensa hidráulica manual (SPECAC) y se ejerce presión.
- 4) La pastilla obtenida ya está preparada para colocarse en el espectrofotómetro infrarrojo y analizarse.

Para analizar estas pastillas se usó el programa Spectre.

3.6 Caracterización cuantitativa de la taurina

3.6.1 High-performance liquid chromatography (HPLC)

El HPLC es una técnica de cromatografía de líquidos de alto rendimiento usada en la química analítica para separar compuestos en una mezcla de sustancias químicas. En esta técnica se utilizan dos fases, una de ellas es la fase móvil que pasa a presión sobre una columna que contiene la otra fase, la fase estacionaria. ⁽²¹⁾

Se utilizó un equipo Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Kioto, Japón) formado por un horno termostático, una unidad desgasificadora, dos bombas unitarias, un inyector automático y un detector diodo array, junto con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo equipado con una interfase de ionización de electrospray. La columna que se empleó era de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4mm, 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y los datos se procesaron con el software LabSolutions de Shimadzu.

El método utilizado se basó en un artículo sobre métodos para la determinación de edaravona y/o taurina en plasma de rata y su aplicación a un estudio farmacocinético ⁽²²⁾ introduciendo algunas modificaciones. Este es un método isocrático que consiste en una fase móvil 90:10 agua: metanol (0.1% ácido fórmico). Con un flujo de 1 mL/min, volumen inyección de 5 microlitros utilizando una columna 100*2,1 y 3,5 micras (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

Para el HPLC creamos una recta de calibrado para poder calcular posteriormente la concentración de taurina en las muestras. Esta recta de calibrado se compone de 6 puntos de concentraciones conocidas (de 0,2 mg/mL a 1,0 mg/mL), entre las que se determinará la cantidad de metabolito que contendrán las nanofibras elaboradas por extrapolación y/o sustitución en la ecuación generada.

3.7 Ensayo in-vitro: Estudio de degradación de fibras con diferentes pH

Con este ensayo se visualizó la degradación de las fibras y se cuantificó la liberación del metabolito, taurina, a diferentes pH y diferentes tiempos. Para ello se utilizó una placa de 24 pocillos que se distribuyó de la siguiente manera: Cada pocillo contenía 5 mg de fibra, habiendo dos muestras por cada tampón de pH y una para el blanco en cada tampón (Figuras 6 y 7)

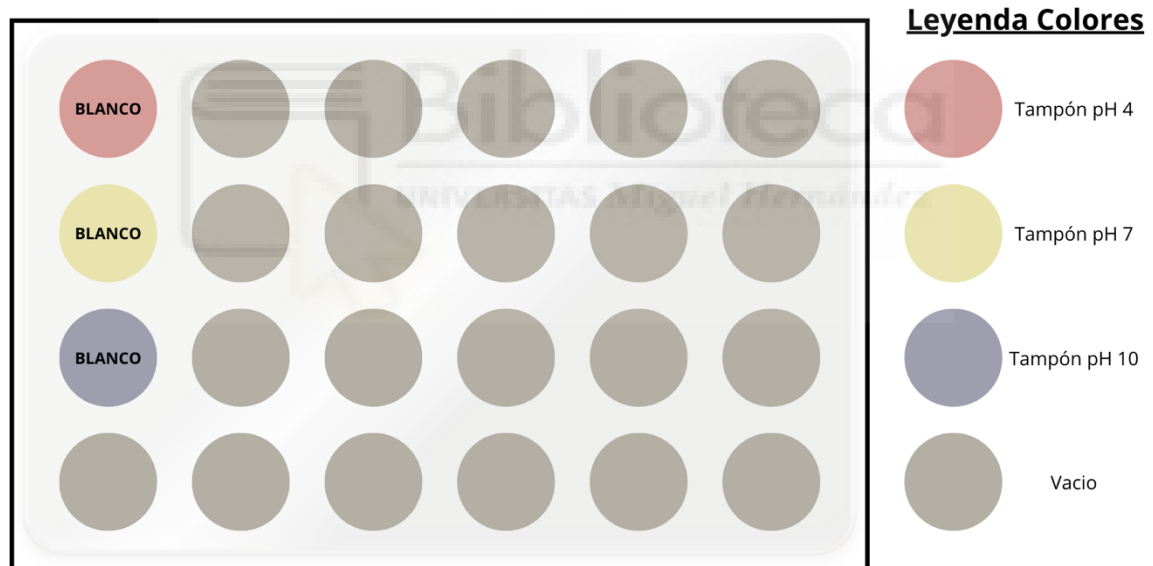


Figura 6: Distribución de las fibras del blanco en los pocillos con los tampones de pH

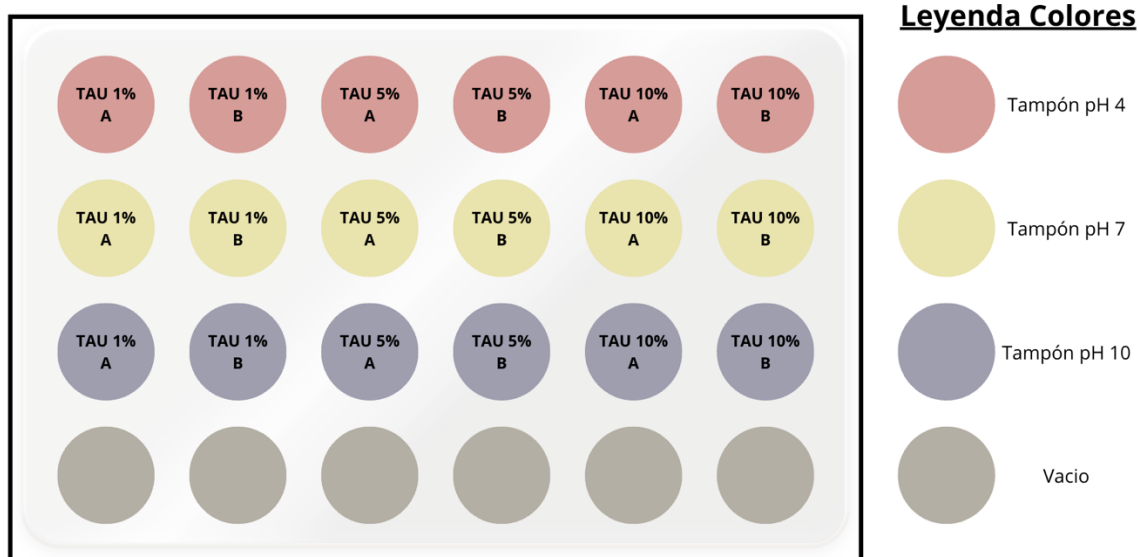


Figura 7: Distribución de las fibras en los diferentes pocillos con tampones de pH

Para preparar estos pocillos se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se prepararon los pocillos que contenían únicamente PMVEMA-Ac, que fueron 3. En el primer pocillo se pusieron 2 mL de una solución tampón de pH 4, en el segundo 2 mL de tampón pH 7 y por último en el tercero 2 mL de tampón pH 10. Se pesaron 15 mg de fibra del blanco de PMVEMA-Ac y a cada uno de estos pocillos se le añadieron 5 mg de nanofibras. (Figura 6).
- 2) Se prepararon los pocillos con fibras de los distintos % de Taurina. Primero se añadieron 2 mL de cada tampón siguiendo el esquema de la figura 7 y después se pesaron 30 mg de cada fibra (PMVEMA-Ac 20% + TAU 1%, PMVEMA-Ac 20% + TAU 5% y PMVEMA-Ac 20% + TAU 10%) añadiendo a cada pocillo 5 mg. De esta forma cada fibra tenía 6 pocillos, 2 por cada tampón pH.

Todo el proceso fue documentado mediante fotografías tomadas al instante de preparar los pocillos, a la 1 h y a las 3 h, para comprobar el grado de degradación que se había producido, visualmente, de las fibras.

Para hacer un proceso más completo se extrajeron alícuotas de 20 μ l de cada porcentaje A y cada pH a cada uno de los tiempos para cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución lo que se había liberado de metabolito. Para cada tiempo se extraían 9 muestras de los diferentes porcentajes/pH, más 3 muestras del blanco teniendo al final un total de 36 alícuotas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la viscosidad de la disolución de Taurina

El primer paso fue medir la viscosidad de las disoluciones para comprobar si tenían suficiente viscosidad para poder formar fibras. Además, es un dato importante que saber ya que a más viscosidad más diámetro tendrán las fibras que se obtendrán.

Para ello se pesaron primero las disoluciones y se calculó su densidad tanto para PMVEMA-Ac como para PMVEMA-Es para luego usar estos datos en la fórmula del viscosímetro, comentada en el punto 3.4.1.

En el caso de este trabajo se utilizó un viscosímetro de 500 ml debido a que era el que menor error daba.

Fórmula de la densidad = gramos / mL de disolución

Fórmula de la viscosidad = $\mu = t(s) \cdot k \cdot \text{Densidad}$

k= 8,2230 (constante) para el viscosímetro de 500 ml

k= 0,4956 (constante) para el viscosímetro de 350 ml

Tabla 1: Peso, densidad, tiempo y viscosidades de las soluciones de Taurina y PMVEMA-Ac. El tiempo se midió por triplicado y se hizo la media.

	Viscosidad (cP)
Blanco PMVEMA-Ac	1489 ± 45
Taurina 1%	2240 ± 25
Taurina 5%	2262 ± 35
Taurina 10%	2602 ± 41

Tabla 2: Datos medidos para calcular la viscosidad de las soluciones de Taurina y PMVEMA-Es. El tiempo se midió por triplicado y se hizo la media. La Viscosidad 1 se calculó con el viscosímetro de 500 mL

	Viscosidad (cP)
Blanco PMVEMA-Es	204 ± 13
Taurina 1%	100 ± 11

Tabla 3: Datos medidos para calcular la viscosidad de las soluciones de Taurina y PMVEMA-Es. El tiempo se midió por triplicado y se hizo la media. La viscosidad 2 se calculó con el viscosímetro el de 350 mL

	Viscosidad (cP)
Blanco PMVEMA-Es	171 ± 8
Taurina 1%	109 ± 3

Una vez obtenidos todos los datos y calculadas las viscosidades ya se puede comparar cómo afecta la taurina al PMVEMA-Ac y al PMVEMA-Es. Las viscosidades se miden en centipoise (cP) que es la medida internacional usada para medir esta característica.

En el PMVEMA-Ac se puede observar que la viscosidad aumenta considerablemente, teniendo las soluciones con taurina el doble de viscosidad que la disolución blanco que únicamente contenía PMVEMA-Ac (aumenta un 50,46%) y la solución con un 10% de Taurina aumenta un 16,15% con respecto a la taurina con una concentración del 1%

Por otro lado, en las soluciones con PMVEMA-Es la viscosidad disminuye en vez de aumentar. Con estas muestras se usaron dos viscosímetros, el de 500 mL y el de 350 mL, esto fue debido a que en el de 500 ml el tiempo de espera para medir el tiempo

que tarda en bajar la solución (apartado 3.4.1) era demasiado corto, este tiempo como ya he mencionado anteriormente no debería ser menor a 2 minutos ni superior a 30, es por ello que se repitió la medición con un viscosímetro de menor flujo (350 mL) y con este ya conseguimos un tiempo más óptimo y un menor error, aunque seguíamos observando la misma variación entre las viscosidades. Teniendo en cuenta únicamente los datos sacados del viscosímetro de 350 mL la solución de Taurina 1%, aunque presenta una viscosidad óptima para producir fibras, disminuye un 36,28% cuando se esperaba que al añadir el metabolito al polímero aumentara la viscosidad. Es por esto por lo que ya se esperaba desde este momento que las fibras no salieran uniformes.

4.2 Preparación de las nanofibras de Taurina

Las nanofibras de taurina con PMVEMA-Ac se prepararon usando la técnica de electrospinning con las condiciones óptimas que se nos proporcionó en el laboratorio según estudios previos como la tesis doctoral de Amalia Mira Carrió (2017), [Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas] ⁽¹⁰⁾. Para ello, se preparó la solución, se cargó la jeringuilla, se unió con la aguja y se colocó el portaobjetos donde se recogía la fibra a una distancia de 10 cm. El flujo se puso a 0,25 ml/h y la potencia a 16 kV. La temperatura se mantuvo entre los 28-30 °C y la humedad a 45-50% aproximadamente.

Para las fibras con PMVEMA-Es la distancia entre la jeringuilla y el portaobjetos se mantuvo a 10 cm y la velocidad del flujo a 0,25 ml/h pero se cambió la potencia a 6,8 kV. Todos estos datos los obtuvimos gracias a previos experimentos optimizados por nuestros compañeros de laboratorio ⁽²³⁾.

4.3 Caracterización de la morfología de las nanofibras de Taurina

4.3.1 Caracterización por microscopía óptica

Gracias a esta técnica se pudo observar la morfología de las fibras antes de llevarlas al FESEM y, además, comprobar que no hubiera fallos u errores como gotas de agua (beads) ⁽²⁴⁾ ni que se hubiera producido el efecto de electro-pulverización, también conocido como electrospray, que se produce cuando el líquido se atomiza ⁽²⁵⁾, dentro

de las fibras, ya que habrían quedado inutilizables para el FESEM, por eso este paso previo es tan importante, para poder hacer un cribado de las mejores fibras. En nuestras fibras (figuras 8, 9, 10, 11 y 12) no presentaron beads ni electrospay por lo que se dio el visto bueno para llevarlas al microscopio electrónico, también conocido como FESEM.

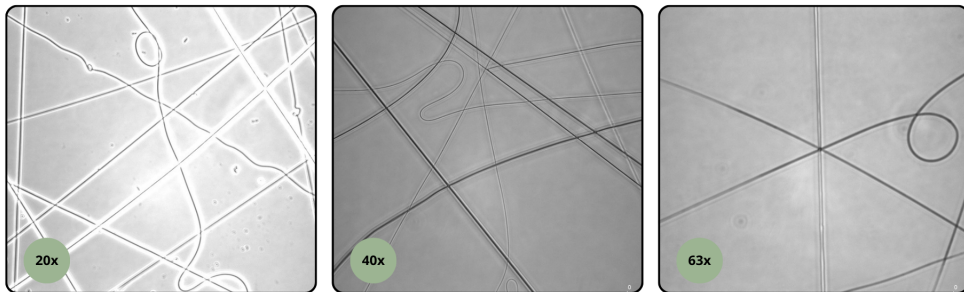


Figura 8: Imágenes de PMVEMA-Ac 20% + TAU 1% en el microscopio óptico a 20x aumentos, 40x aumentos y 63x aumentos.

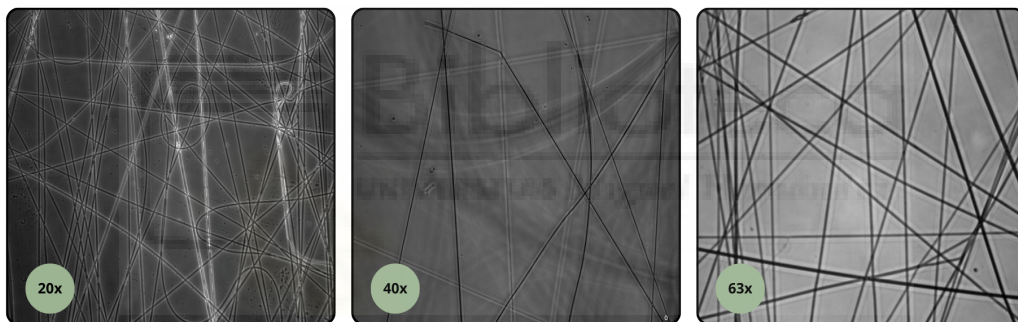


Figura 9: Imágenes de PMVEMA-Ac 20% + TAU 5% en el microscopio óptico a 20x aumentos, 40x aumentos y 63x aumentos.

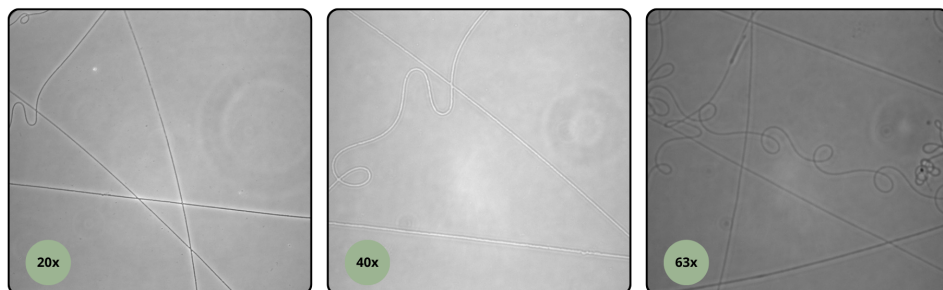


Figura 10: Imágenes de PMVEMA-Ac 20% + TAU 10% en el microscopio óptico a 20x aumentos, 40x aumentos y 63x aumentos.

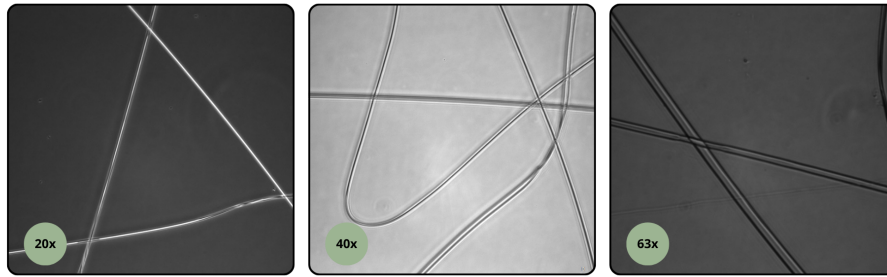


Figura 11: Imágenes de Blanco PMVEMA-Es en el microscopio óptico a 20x aumentos, 40x aumentos y 63x aumentos.

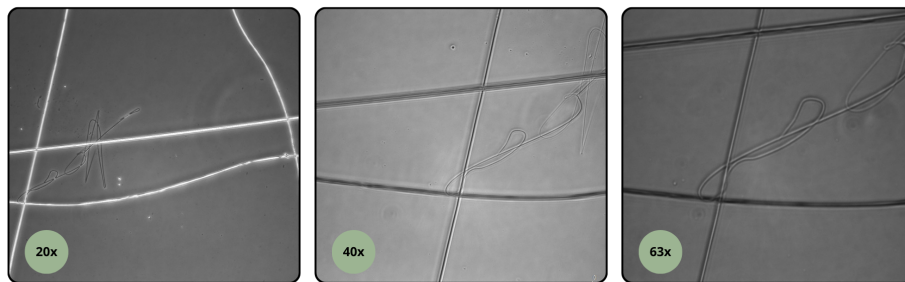


Figura 12: Imágenes de PMVEMA-Es + TAU 1% en el microscopio óptico a 20x aumentos, 40x aumentos y 63x aumentos.

4.3.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Para la caracterización fisicoquímica de diámetros de las fibras se usó un microscopio de barrido de emisión de campo, también conocido como FESEM. Las fibras se llevaron al microscopio después de comprobar por microscopía óptica que no había defectos en las fibras. Las imágenes obtenidas gracias a este equipo permitieron observar morfologías diferentes entre las nanofibras tanto a distintas concentraciones como con principio activo o sin él.

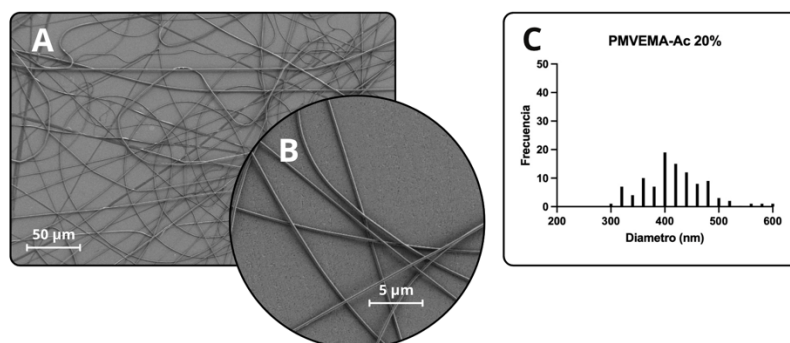


Figura 13: Imágenes del Blanco de PMVEMA-Ac 20% por FSEM a 50 μm (A), 5 μm (B) e histograma (B)

El diámetro de nuestras fibras de PMVEMA-Ac 20% sin taurina, blanco, fue de 299 ± 40 nm. En este histograma (Figura 13.C) se puede observar como la mayoría de las fibras presentan un diámetro de entre 250 y 350 nm, aunque también se puede apreciar dos subpoblaciones que se encuentran en los 200 y 400nm respectivamente, pero estas son bastante menores en comparación y se puede decir que se obtuvieron resultados bastante equitativos.

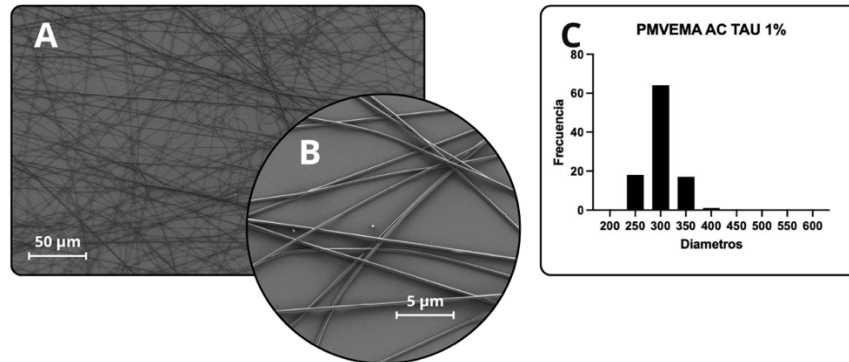


Figura 14: Imágenes del PMVEMA-Ac 20% + Taurina 1% por FSEM a 50 μ m (A), 5 μ m (B) e histograma (B)

En las fibras de PMVEMA-AC 20% + TAU 1% se obtuvo un diámetro promedio de 304 ± 27 nm. En este caso se puede observar que en el histograma (Figura 14.C) las fibras varían muy poco de la medida de 300nm, presentando una distribución gaussiana simétrica a diferencia de con el blanco, por lo que, al añadir el metabolito, taurina, y aumentar la viscosidad, como hemos anteriormente (Tabla 1) el diámetro de las fibras aumenta, que es el resultado esperado ⁽¹⁰⁾

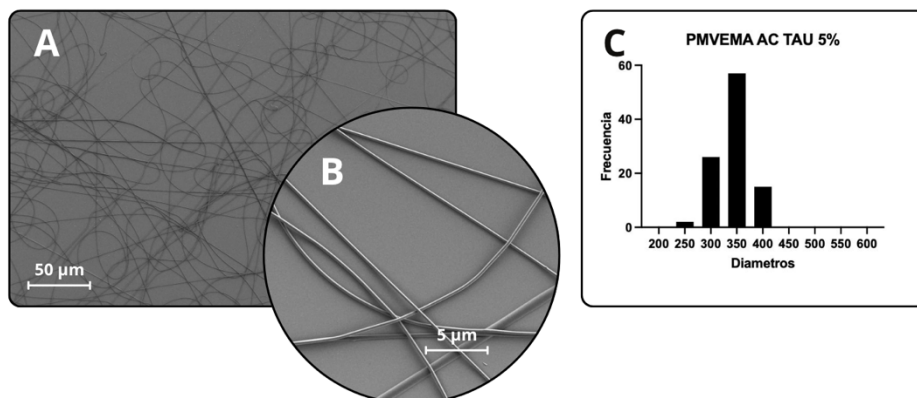


Figura 15: Imágenes del PMVEMA-Ac 20% + Taurina 5% por FSEM a 50 μ m (A), 5 μ m (B) e histograma (B)

En el caso de las fibras de PMVEMA-AC 20% + TAU 5% medimos un diámetro de 342 ± 28 nm y la viscosidad (Tabla 1) que aumenta en comparación de la solución de PMVEMA-AC 20% + TAU 1%, no es un aumento realmente considerable, lo que concuerda también con el diámetro de las fibras, ya que, aunque también se ve algunas poblaciones de fibras a 300 nm la mayoría salen dentro del rango de 350 nm habiendo incluso más fibras dentro de la población de 400 nm que en la de 200 nm, pero manteniendo la simetría. Estos datos pueden haberse debido a la temperatura y/o humedad de ese día en el laboratorio y en la sala de electrohilado.

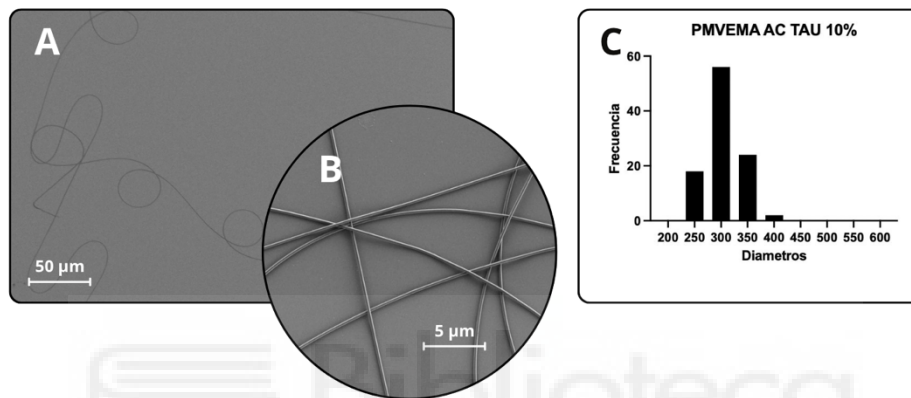


Figura 16: Imágenes del PMVEMA-Ac 20% + Taurina 10% por FSEM a 50 μ m (A), 5 μ m (B) e histograma (B)

Por último, en cuanto a las disoluciones con PMVEMA-AC 20%, tenemos la disolución de PMVEMA-AC 20% + TAU 10% con un diámetro promedio de 307 ± 32 nm que es un diámetro más acorde con lo que esperábamos, sin tener en cuenta los resultados del 5%. En el histograma (Figura 16.C) se puede ver más homogeneidad con respecto a las fibras del 1% ya que la población más predominante es la de 300 nm y las otras dos subpoblaciones más cercanas a esta, 250 nm y 350 nm.

Cuando aumenta la concentración de Taurina el diámetro de las fibras debería disminuir ⁽¹⁰⁾, en nuestro caso el diámetro entre las fibras al 1% de Taurina y las del 10% sí que disminuye, pero en las fibras del 5% aumenta un poco más de lo debido.

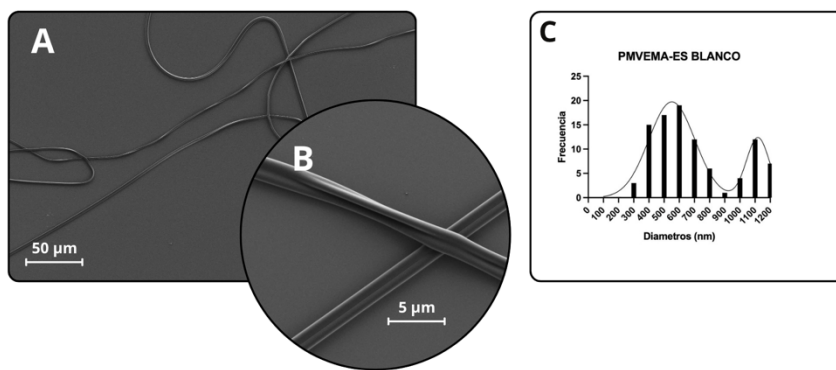


Figura 17: Imágenes del Blanco PMVEMA-Es por FSEM a 50 μm (A), 5 μm (B) e histograma (B)

En el caso del PMVEMA-Es el diámetro de las fibras es 720 ± 298 nm, teniendo una dispersión muy elevada y, como se puede comprobar en el histograma (Figura 17.C), resultados muy dispares, ya que las poblaciones se reparten entre los 300 y los 1200 nm habiendo varias poblaciones con muchas cantidades de datos creando así un histograma muy disperso.

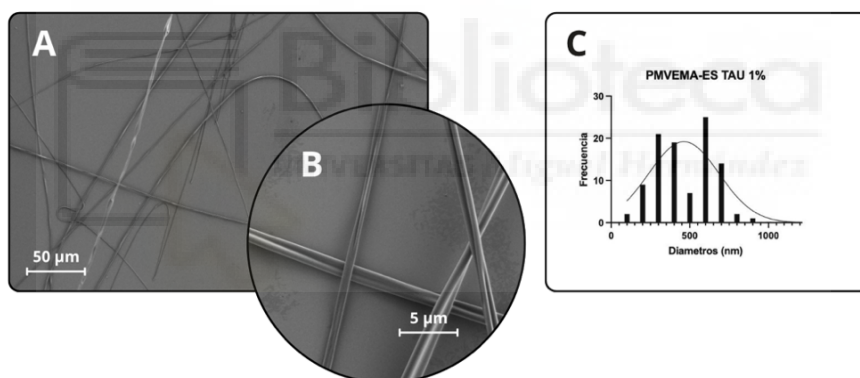


Figura 18: Imágenes del PMVEMA-Es + Taurina 1% por FSEM a 50 μm (A), 5 μm (B) e histograma (B)

En el caso del PMVEMA-Es con 1% de Taurina el diámetro de las fibras 456 ± 180 nm, presentando una situación parecida que en el histograma anterior (Figura 17.C) en este histograma (Figura 18.C) los datos se encuentran repartidos por todo el histograma sin presentar homogeneidad. Además, la viscosidad (Tabla 3) disminuía respecto a la del blanco y en cambió las fibras disminuyen su tamaño respecto con

las del PMVEMA-Es. Es por estos motivos por los que se decidió no seguir con estas muestras del PMVEMA-ES en las pruebas de Infrarrojo y HPLC.

4.4 Evaluación cualitativa mediante Infrarrojo

La prueba cualitativa de las nanofibras se realizó mediante espectroscopia infrarroja, su preparación se explica en el apartado 3.5.

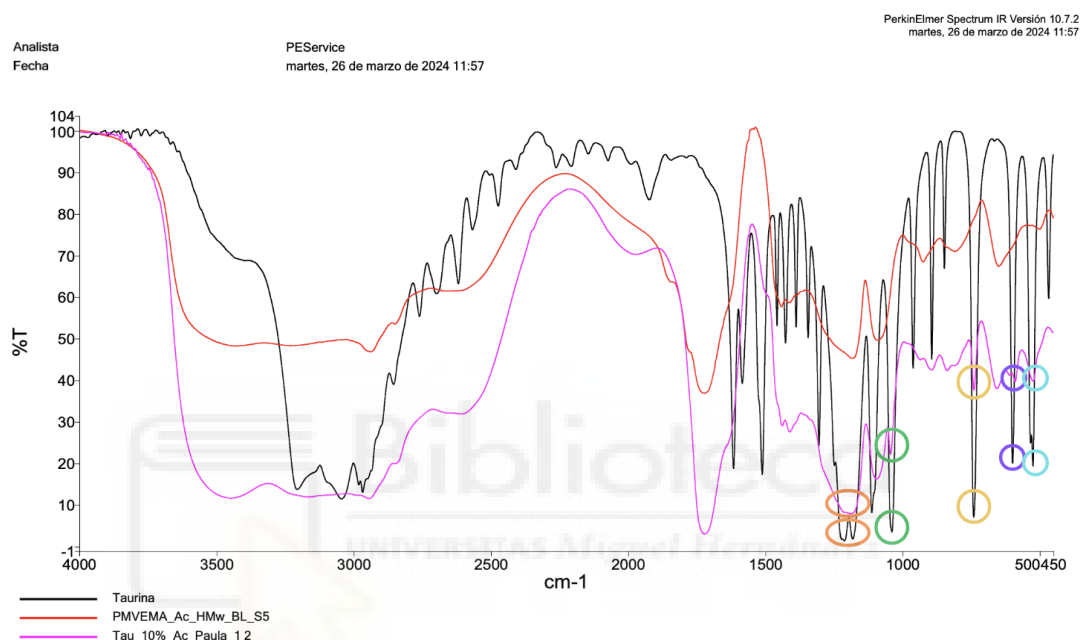


Figura 19: Infrarrojo comparando Taurina (línea negra), PMVEMA-Ac 20% (línea roja) y Tau10%+PMVEMA-Ac (línea violeta)

Se puede observar que presenta ciertas bandas características de deformación del grupo amino protonado ($R-NH_3^+$) en la taurina, (vibraciones simétricas y asimétricas) en la región de 1500 a 1650 cm^{-1} pero que se solapan con las bandas del PMVEMA-Ac (línea roja). Sin embargo, las bandas prominentes observadas en el espectro se deben a los tramos simétricos (1034 cm^{-1}) del grupo ácido sulfónico ($R-SO_3H$) (señalada en la figura con círculos verdes), estos se consiguen apreciar con facilidad en las fibras que contienen 10% de taurina (línea violeta), se pueden observar bastante bien y se consiguen diferenciar de las bandas del PMVEMA-Ac, motivo por el que se determina que la taurina había sido incluida en el polímero. Además, hay un incremento de la transmitancia importante en las bandas asimétricas (1216 cm^{-1}) del grupo SO_3H y señales del grupo NH_3 (1182 cm^{-1}) (señalado con círculos naranjas),

probablemente al haber sido insertada en el polímero y la posible interacción con alguno de sus grupos funcionales. Por último, se diferencian claramente las bandas propias de la Taurina (línea negra) en las fibras poliméricas que los contiene en particular, las señaladas con círculos de colores (amarillo, lila y azul) en la huella digital (por debajo de 1000 cm^{-1}), como las de balanceo (“rocking”) producidas en la deformación del grupo metileno ($-\text{CH}_2-$).

Como puede apreciarse en la banda en la que Taurina está incorporado en el polímero, se ven pequeños cambios en los espectros de IR al comparar su espectro con otros correspondientes al aminoácido en la zona de los círculos de colores marcados ⁽²⁶⁾.

4.5 Evaluación cuantitativa: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para analizar la cantidad de taurina que había sido incorporada dentro de las fibras, se utilizó la técnica cuantitativa, HPLC. Para ello, se elaboró una recta de calibrado.

Con esta recta se obtuvieron los resultados de cantidades reales de taurina incorporadas en las fibras. Con estos resultados y los valores teóricos, se pudieron calcular los porcentajes reales de aminoácido que se habían conseguido encapsular, conocido como eficacia de encapsulación.

La curva de calibrado resultó una regresión lineal en base a las áreas que se obtuvieron del HPLC frente a las concentraciones patrón. Las concentraciones que se utilizaron fueron del rango de 0,20-1,00 mg/ml (puntos descritos en el apartado 3.6.2).

Al representar esta recta se obtuvo la ecuación [$y = 2E+08x$] con un coeficiente de correlación [$R^2 = 0,9487$]. El coeficiente debería ser lo más cercano a 1 como sea posible, siendo lo ideal una $R^2 = 0,99$, ya que esto significa que un ajuste lineal perfecto ⁽²⁷⁾. Sin embargo, conseguir esto en la ciencia no siempre es posible ⁽²⁸⁾. En este caso el resultado ha podido ser afectado por errores de pipeteo o incluso del propio equipo de cromatografía, ya que este es muy sensible y estaba teniendo algunos problemas.

Dado que la primera vez que se realizó el ensayo de cuantificación de fibras hubo diversos problemas con el equipo de cromatografía, se decidió hacer una única recta que sirviera tanto para la evaluación de eficacia de encapsulación de las fibras como de la liberación de taurina a los diferentes pH. Por tanto, al hacer una única recta, se analizaron ambos ensayos el mismo día. Una vez analizados los cromatogramas de donde se obtuvieron las áreas de cada patrón, se representó y calculó la recta de calibrado; se calculó la concentración real de taurina dentro de la fibra y se comparó con la teórica y, con ello se analizó el porcentaje de taurina que se consiguió encapsular. (Tabla 4).

Tabla 4: Concentraciones teóricas, reales y porcentaje encapsulado de taurina

VIAL	Concentración estimada (mg/ml)	Concentración medida en HPLC (mg/ml)	Porcentaje de TAU encapsulado (%)
Nanofibras de PMVEMA-Ac 20% + TAU 1%	0,310	0,266	86
Nanofibras de PMVEMA-Ac 20% + TAU 5%	0,650	0,263	40
Nanofibras de PMVEMA-Ac 20% + TAU 10%	0,50	0,256	51

Las fibras del 1% parece, según los datos obtenidos, que admiten más carga de taurina, el motivo de esto probablemente sea porque las fibras del 5% y 10% empiezan a saturarse dando resultados de menor cantidad incorporada. Para cerciorarse de estos datos se debería volver a valorar el ensayo, ya que el equipo cromatográfico no estaba en unas condiciones óptimas pudiendo así introducir errores instrumentales. Futuros experimentos de cromatografía serán realizados para comprobar estos resultados.

4.6 Estudio de degradación con diferentes pH

Este es un *ensayo in vitro* para estimar lo máximo posible como se deterioran o resisten las fibras con este aminoácido a los diferentes pH.

Al añadir las fibras de taurina a los pocillos con los tampones pH se disolvieron prácticamente al instante, como se puede observar en la figura 22, en la que prácticamente no se aprecian las fibras a tiempo 0h. Esto puede deberse a la gran solubilidad que tienen tanto la taurina como el PMVEMA-Ac con el agua (^{11,12}) y teniendo presente que la principal composición de los tampones pH es agua, es lógico esperar este resultado.

A tiempo 0h apenas se aprecian algunos fragmentos de fibra en los pocillos de TAU 5% a pH 7 y un poco en los del 10% a pH 4 y 7.

Las figuras 22, 23 y 24 siguen el esquema de las figuras 6 y 7 (metodología 3.7).

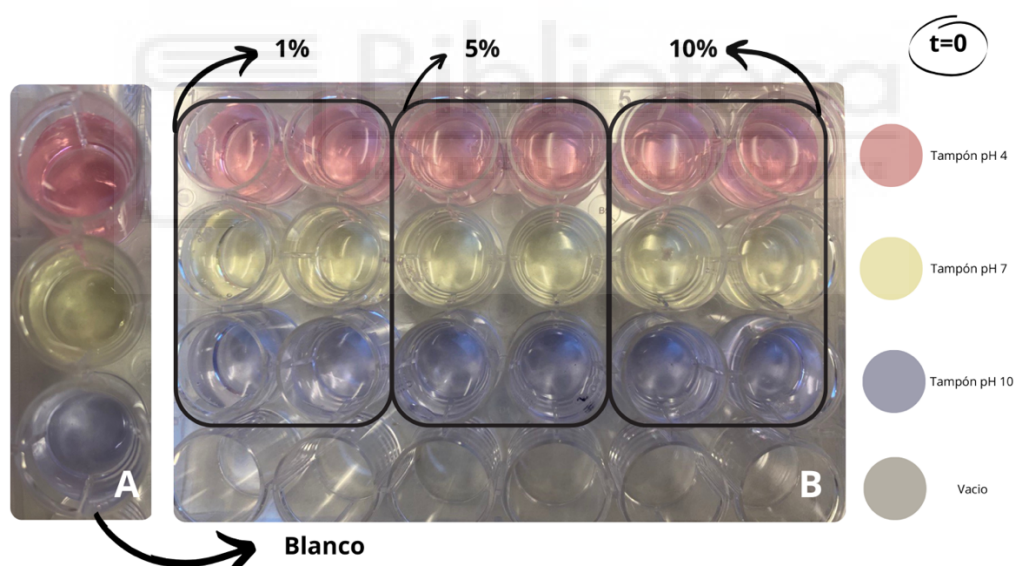


Figura 20: Nanofibras de PMVEMA-Ac y TAU en tampones de pH a tiempo = 0h. Blanco (A) Fibras con Tau (B)

Teniendo en cuenta que al tiempo: instante, ya no se podían apreciar prácticamente fibras se decidió tomar solo fotografías a los tiempos 1h y 3h para comprobar la degradación total, sin llegar así a hacer fotografías a 8h, 12h o 24h como se tenía programado.

Como se puede observar en las figuras 23 (a 1h) y 24 (a 3h) ya no se aprecia ningún rastro de fibra.

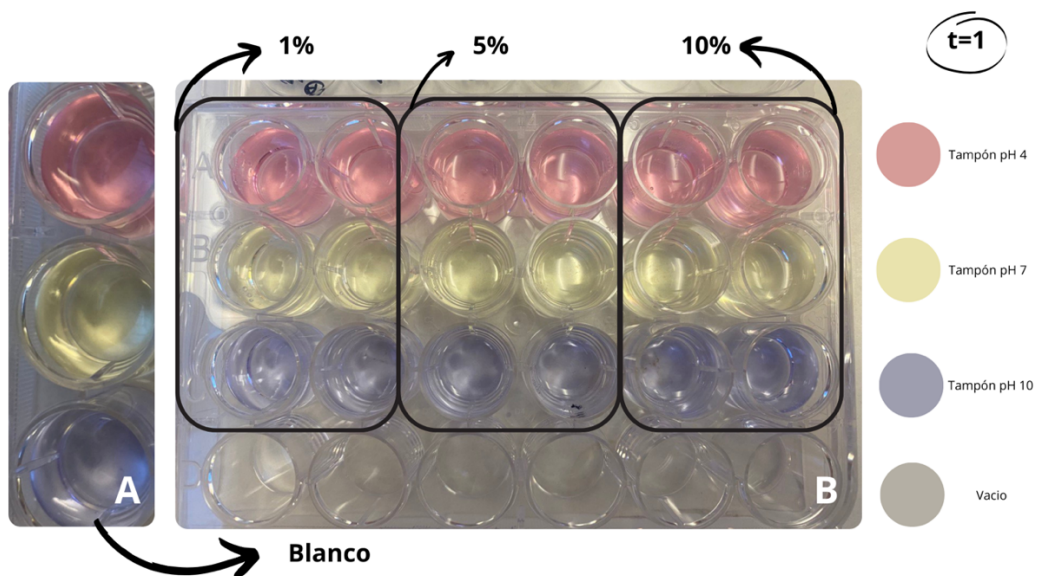


Figura 21: Nanofibras de PMVEMA-Ac y TAU en tampones de pH a tiempo = 1h. Blanco (A) Fibras con Tau (B)

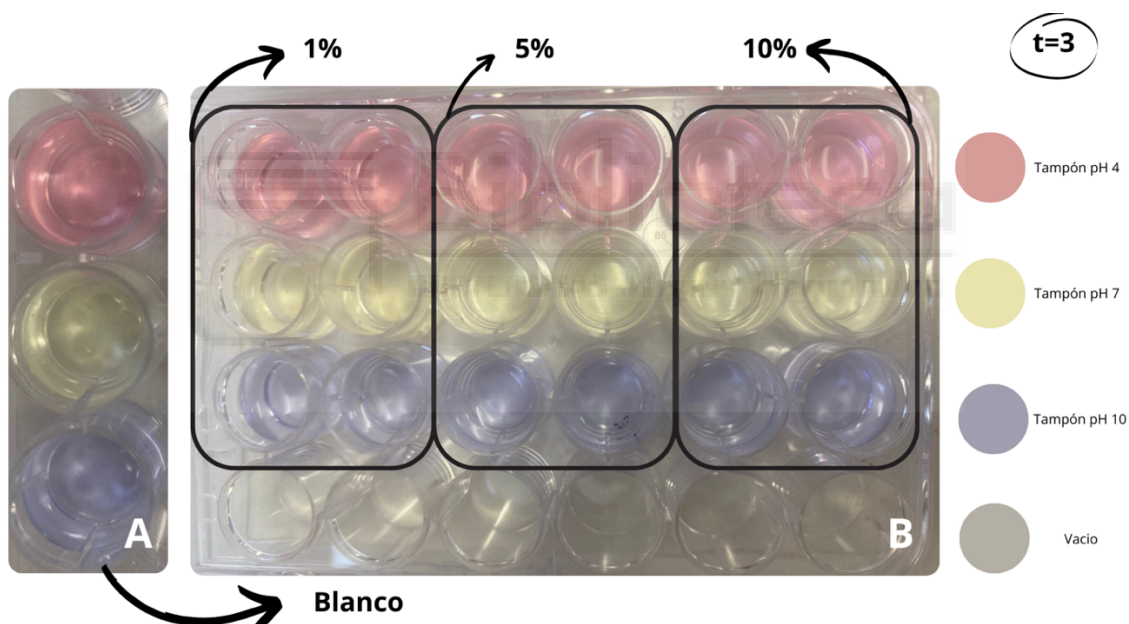


Figura 22: Nanofibras de PMVEMA-Ac y TAU en tampones de pH a tiempo = 3h. Blanco (A) Fibras con Tau (B)

Para poder hacer una cuantificación del porcentaje liberado de taurina en los diferentes tiempos se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) alícuotas tomadas a diferentes tiempos, recién incluidas en el pocillo, a la hora y a las tres horas. Con esas alícuotas, se obtuvieron los porcentajes de la Figura 25.

Las concentraciones de PMVEMA-Ac + Tau 1% y PMVEMA-Ac + Tau 5% quedan fuera de nuestra curva de calibrado, la cual va de 0,2 a 1,0 mg/ml, por tanto los resultados obtenidos con Tau 1% y 5% no se pueden cuantificar debido a que se

queda fuera de la curva de calibración y no es posible su interpolación, dejando fuera a la mayoría de los resultados ya que son incuantificables, aun así, los resultados del 10% si quedan dentro de la recta y nos sirven para analizar lo que les ocurre a las fibras de PMVEMA-Ac + Tau en los diferentes tampones pH.

Aunque visualmente a t=0h no se apreciaban prácticamente nanofibras en los tampones, la realidad de los resultados es que la taurina aún no se había liberado, es a partir de t=1h cuando la taurina empieza a liberarse, sin embargo, a t=3h la liberación disminuye, esto se debe a que diluimos las muestras con más pH cada vez que sacábamos una alícuota para llevarla al HPLC.

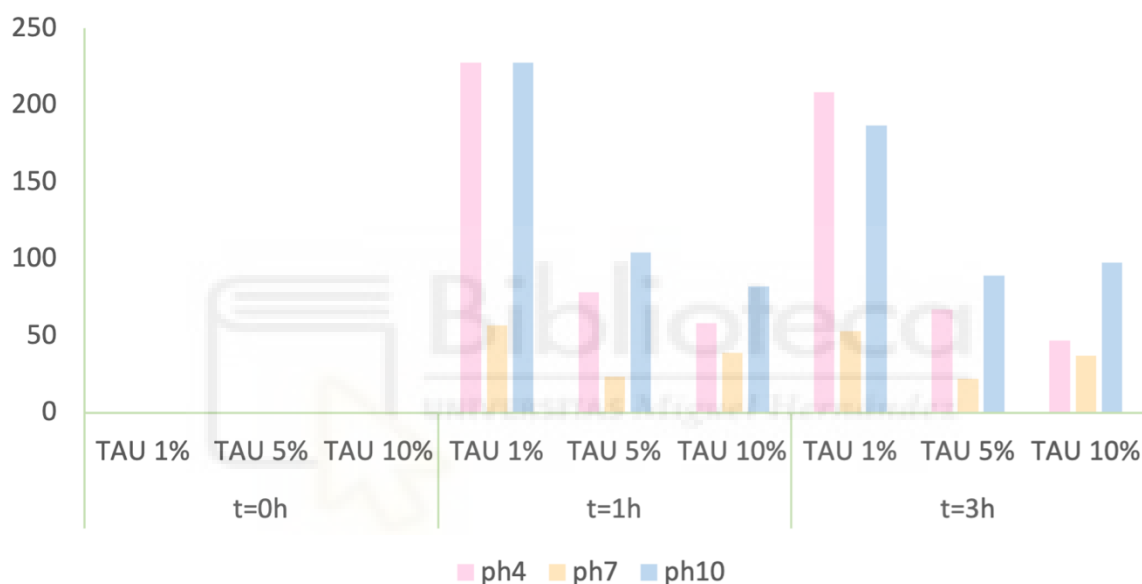


Figura 23: Porcentajes de liberación de taurina en función de los tiempos medidos en distintas soluciones de pH.

El blanco no se incluye en la gráfica porque no se considera necesario, dado que la fibra no ha liberado en ningún tiempo ni ningún pH.

Si ahora observamos los tampones de pH se puede ver que a pH ácido (pH4) y a pH básico (pH10) se libera más taurina que a pH neutro (pH7), de hecho, a pH10 se libera prácticamente toda la taurina y a pH4 prácticamente la mitad de esta. Como el polímero es estable a pH ácido y neutro es probable que mantenga retenido aun el aminoácido, sin embargo, a pH básico la liberación sea mayor como consecuencia de cambios estructurales en la disposición de las cargas iónicas del polímero quedándose en forma dianionica. Aunque están fuera de la recta, los resultados del

5% (que son los más cercanos que podrían entrar) tienen unos resultados parecidos en cuanto a porcentajes a los del 10%. Todos los resultados están pendientes de repetirse para poder asegurar la curva de calibrado y los posteriores ensayos de liberación y estabilidad a diferentes pH.



5. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado se han estudiado los diferentes aspectos relacionados con la encapsulación de taurina mediante la síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es.

Las conclusiones más detalladas de este trabajo son las siguientes:

1. Las nanofibras sintetizadas con PMVEMA-Ac + TAU y PMVEMA-Es + TAU, electrohiladas a 16 kV de voltaje, 0,25ml/h de flujo y 10 cm de distancia al colector y 6,8 kV de voltaje, 0,25ml/h de flujo y 10 cm de distancia al colector respectivamente, fueron estables y sin defectos visibles.
2. Mediante la evaluación cualitativa de las fibras con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo determinamos que las fibras de PMVEMA-Ac + TAU tenían un diámetro promedio de 318 ± 17 nm. En cambio, en las fibras de PMVEMA-Es + TAU el diámetro era de 456 ± 181 nm con una morfología no homogénea y alta dispersión, por lo que se decidió no seguir con estas fibras.
3. Gracias a la técnica del infrarrojo pudimos comprobar que las fibras del PMVEMA-AC + Taurina incorporaron taurina.
4. Según datos analíticos cuantificables, parece que este aminoácido se incorpora en cantidades menores más fácilmente a las de mayor cantidad. Al 1% se observa que puede llegar a valores del 85%, mientras que a partir del 5% de concentración de taurina en fibra para que empiece a saturarse.
5. En cuanto al estudio de degradación de nanofibras con diferentes pH se determinó que las nanofibras parece que se degradan al instante visualmente y, mediante la cromatografía líquida de alta resolución se establece que se liberaban rápidamente. La fibra PMVEMA-AC + Taurina cargada al 10% p/p se liberan mejor a pH básico seguido del pH ácido. Este ensayo debería volverse a realizar para valorar con precisión y veracidad los resultados y tener una mejor estadística.

En resumen, este trabajo contribuye al avance en el campo de la encapsulación de metabolitos en forma de nanofibras que se pueden usar para uso oral y otras aplicaciones clínicas como parches transdérmicos y que deja el camino abierto para futuras investigaciones que podrían profundizar más en el desarrollo más avanzado de técnicas de caracterización para la eficacia y estabilidad de las fibras.



6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Barrueco, Nélica, Martínez Fernández-Llamazares, Cecilia, Durán, Esther, Martínez Marín, María Teresa, & Relaño García, Cristina. (2008). Administración de medicamentos por vía oral: Interacciones medicamento - alimento. *Index de Enfermería*, 17(1), 53-57. Recuperado en 24 de abril de 2024, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1132-12962008000100012&lng=es&tng=es.
- ² Zhang, L., Yang, W., Hu, C., Wang, Q., & Wu, Y. (2018). Properties and applications of nanoparticle/microparticle conveyors with adjuvant characteristics suitable for oral vaccination. *International journal of nanomedicine*, 13, 2973–2987. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154743>
- ³ J.A.Armijo, Tema 4. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos, 1997.
- ⁴ Mira A, Sainz-Urruela C, Codina H, Jenkins SI, Rodriguez-Diaz JC, Mallavia R, Falco A. Physico-Chemically Distinct Nanomaterials Synthesized from Derivates of a Poly(Anhydride) Diversify the Spectrum of Loadable Antibiotics. *Nanomaterials*. 2020; 10(3):486. <https://doi.org/10.3390/nano10030486>
- ⁵ Hernández Marín M, (2020). Desarrollo de nanofibras poliméricas con retinoides para el tratamiento de la hidradenitis supurativa (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Miguel Hernández. Elche, Alicante.
- ⁶ Molfino, H. Mauricio Gonzales, Alcalde-Yañez, Alexander, Valverde-Morón, Valery, & Villanueva-Salvatierra, Dulce. (2020). Electrospinning: Avances y aplicaciones en el campo de la biomedicina. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(4), 706-713. <https://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v20i4.3004>
- ⁷ Serrano Espinosa J. (2020). Optimización de fabricación de nanofibras electrohiladas de soluciones proteicas (Trabajo de Fin de Máster). Universidad Miguel Hernández. Elche, Alicante.

⁸Arias Sánchez A. (2015). Nanofibras poliméricas con ácido 5-aminolevulínico: Preparación, caracterización y estudio de liberación in vitro (Trabajo Fin de Grado). Universidad Miguel Hernández. San Juan de Alicante.

⁹ Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325-347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

¹⁰ Mira Carrió A. (2017). Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas (Tesis Doctoral). Universidad Miguel Hernández. Elche.

¹¹ Ficha de datos de seguridad (SDS) 191124 de Sigma-Aldrich para el Poly(methyl vinyl-ether-alt-maleic-acid)
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/aldrich/191124?icid=sharepdp-clipboard-copy-productdetailpage>. Consultado: 2024

¹² Gong, W., Li, P., & Rohani, S. (2022). Taurine in several aqueous binary solvents: Solubility prediction, measurement, modeling, solvent effect, and thermodynamics. *Journal of Molecular Liquids*, 367, 120522. doi:10.1016/j.molliq.2022.120522

¹³ Lacera, A., & Resumen, R. Revista del instituto de investigaciones tropicales. Roles alimenticios y metabólicos de la Taurina y la L-Carnitina, 2004.

¹⁴ Cañas D, Patricio. (2002). ROL BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL DE LA TAURINA Y SUS DERIVADOS. *Revista chilena de nutrición*, 29(3), 286-292. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182002000300003>

¹⁵ Huxtable R. J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological reviews*, 72(1), 101–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.101>

¹⁶ Weiss, S. J., Klein, R., Slivka, A., & Wei, M. (1982). Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *The Journal of clinical investigation*, 70(3), 598–607. <https://doi.org/10.1172/jci110652>

¹⁷ Thomas, E. L., Grisham, M. B., & Jefferson, M. M. (1983). Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 72(2), 441–454. <https://doi.org/10.1172/jci110992>

¹⁸ Laidlaw, S. A., Grosvenor, M., & Kopple, J. D. (1990). The taurine content of common foodstuffs. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 14(2), 183–188. <https://doi.org/10.1177/0148607190014002183>

¹⁹Ficha de información técnica de acofarma para formulas magistrales. <https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f23b63783ecbbae.pdf>
Consultado: 2024

²⁰ Amariei N, Manea LR, Berteza AP, Berteza A, Popa A. The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2017;209(1):012092

²¹Thermofisher. Conceptos básicos de la HPLC. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html#:~:text=¿Qué%20es%20HPLC%3F,no%20volátiles%20en%20muestras%20líquidas>. Consultado: 2024

²² Tang, D., Bian, T., Zheng, X., Li, Y., Wu, X., Li, Y., . . . Jiang, S. (2014). LC-MS/MS methods for the determination of edaravone and/or taurine in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 28(9), 1173-1182. doi:10.1002/bmc.3139

²³ Badía Hernández P.V. (2022) Síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas como sistema de liberación de antineoplásicos en un modelo in vitro de glioblastoma (Trabajo Fin de Máster) Universidad Miguel Hernández. Elche, Alicante.

²⁴ Leach, M. K., Feng, Z. Q., Tuck, S. J., & Corey, J. M. (2011). Electrospinning fundamentals: optimizing solution and apparatus parameters. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (47), 2494. <https://doi.org/10.3791/2494>

²⁵ Tycova, A., Prikryl, J., Kotzianova, A., Datinska, V., Velebny, V., & Foret, F. (2021). Electrospray: More than just an ionization source. *Electrophoresis*, 42(1-2), 103-121. doi:10.1002/elps.202000191

²⁶ Kumar, N., Thomas, S., Tokas, R. B., & Kshirsagar, R. J. (2014). Investigation on the adsorption characteristics of sodium benzoate and taurine on gold nanoparticle film by ATR–FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 614-618. doi:10.1016/j.saa.2013.09.014

²⁷ Rodríguez, E. M., Maximización, V., Valor, D., Vi, & Conclusiones. Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal: Publicado 2005

²⁸ Palma, R. P. Análisis crítico del coeficiente de determinación (R^2), como indicador de la calidad de modelos lineales y no lineales critical analysis of the coefficient of determination (R^2), as an indicator of the quality of linear and non-linear models, 2022.

