



TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso académico 2024-2025

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Facultad de Ciencias Experimentales

FUNCIONALIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS CON FLUORÓFOROS PARA LA SÍNTESIS DE NANOFIBRAS CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

Autora

Paula Morant Lloret

Tutor

Dr. Ricardo Mallavia Marín

Cotutores

Dra. Rocío Díaz Puertas y Biol. Pedro Valentín Badía Hernández

Departamento

Farmacología, Pediatría y Química orgánica

Área de conocimiento

Química inorgánica



Resumen

La búsqueda de nuevas herramientas para la bioimagen no invasiva ha impulsado el desarrollo de materiales fluorescentes biocompatibles, capaces de integrarse en sistemas biomédicos sin comprometer la viabilidad celular ni la calidad de señal. Este trabajo tiene como objetivo la síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas fluorescentes mediante la funcionalización del biopolímero PMVEMA (poli(metil vinil éter-alt-anhídrido maleico)) con los fluoróforos 5-aminofluoresceína (5AF) y 1-pirenometilamina (Pyr) mediante reacciones en microondas de síntesis, obteniéndose copolímeros fluorescentes que fueron caracterizados por espectroscopía UV-Vis, de fluorescencia y FTIR. Se comprobó que los fluoróforos fueron incorporados sin perder sus propiedades ópticas. Se sintetizaron nanofibras mediante electrohilatura, y su morfología y fluorescencia se evaluaron mediante microscopía óptica, confocal y FESEM, mostrando fibras uniformes y fluorescentes, con una intensidad proporcional a la cantidad de fluoróforo presente. Finalmente, los polímeros conjugados no mostraron efectos citotóxicos en líneas celulares de queratinocitos humanos. Este estudio demuestra que las nanofibras obtenidas podrían aplicarse en bioimagen, proponiéndose estudios futuros para evaluar su comportamiento en modelos biológicos más complejos.

Palabras clave: nanofibras; PMVEMA; electrohilatura; 5-aminofluoresceína; 1-pirenometilamina.

Abstract

The search for new tools for noninvasive bioimaging has driven the development of biocompatible fluorescent materials that can be integrated into biomedical systems without compromising cell viability or signal quality. The aim of this work is the synthesis and characterization of fluorescent polymeric nanofibers by functionalization of the biopolymer PMVEMA (poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride)) with the fluorophores 5-aminofluorescein (5AF) and 1-pyrenomethylamine (Pyr) by microwave synthesis reactions, obtaining fluorescent copolymers that were characterized by UV-Vis, fluorescence and FTIR spectroscopy. It was verified that the fluorophores were incorporated without losing their optical properties. Nanofibers were synthesized using electrospinning, and their morphology and fluorescence were evaluated by optical, confocal and FESEM microscopy, showing uniform and fluorescent fibers, with an intensity proportional to the amount of fluorophore present. Finally, the conjugated polymers showed no cytotoxic effects on human keratinocyte cell lines. This study demonstrates that the nanofibers obtained could be applied in bioimaging, proposing future studies to evaluate their behavior in more complex biological models.

Keywords: nanofibers; PMVEMA; electrospinning; 5-aminofluorescein; 1-pyrenemethylamine

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Nanomateriales.....	6
1.1.1. Polímeros	6
1.1.2. Nanofibras poliméricas	7
1.2. Bioimagen.....	7
1.2.1. Fluoróforos	8
1.2.1.1. 5-Aminofluoresceína.....	8
1.2.1.2. 1-Pirenometilamina.....	9
1.2.2. Polímeros fluorescentes	10
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
2.1. Antecedentes	11
2.2. Objetivo	12
2.3. Objetivos específicos	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Reactivos y disolventes.....	13
3.2. Funcionalización del PMVEMA con fluoróforos	13
3.2.1. Síntesis con microondas de PMVEMA-5AF.....	14
3.2.2. Síntesis con microondas de PMVEMA-Pyr.....	14
3.3. Caracterización de los polímeros funcionalizados.....	14
3.3.1. Espectroscopía ultravioleta (UV-Vis).....	14
3.3.2. Espectroscopía de fluorescencia	15
3.3.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	16
3.4. Síntesis de nanofibras	16
3.4.1. Preparación de las disoluciones	16
3.4.2. Electrohilatura	16
3.5. Caracterización de las nanofibras	17
3.5.1. Microscopía óptica.....	18
3.5.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	18
3.5.3. Microscopía confocal de fluorescencia	18
3.6. Cultivos celulares.....	19
3.6.1. Ensayo de Citotoxicidad MTT	19
3.7. Análisis de datos	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Síntesis y caracterización del PMVEMA-5AF y PMVEMA-Pyr	21

4.1.1. Espectros de emisión UV-Vis.....	21
4.1.2. Espectroscopía de fluorescencia	22
4.1.3. Espectroscopía FT-IR.....	23
4.2. Caracterización de las nanofibras con PMVEMA-fluoróforo	24
4.2.1. Microscopía óptica.....	24
4.2.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	25
4.2.3. Microscopía correlativa.....	26
4.3. Ensayos celulares.....	26
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS	30
7. BIBLIOGRAFÍA	31



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanomateriales

Los nanomateriales poseen dimensiones del orden de un nanómetro, es decir, una milmillonésima parte de un metro [1]. Estos materiales se utilizan en muchos campos como la cosmética, la electrónica, los sensores, el equipamiento deportivo y la biomedicina, entre otros [2].

Los nanomateriales pueden clasificarse según diversos criterios, principalmente en función de sus dimensiones, su morfología y su composición química. Según sus dimensiones, se distinguen nanomateriales cero-dimensionales, unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales [3]. En cuanto a su morfología, pueden presentarse como nanopartículas, nanotubos, nanofibras, nanoplacas o nanocomplejos, entre otros [4,5]. Finalmente, en cuanto a su composición química, los nanomateriales también presentan una gran diversidad, pudiendo clasificarse en basados en carbono; metálicos; orgánicos, como los polímeros; inorgánicos no metálicos; híbridos; entre otros [4] (**Figura 1**). En este trabajo nos hemos centrado concretamente en las nanofibras sintetizadas a partir de un polímero.

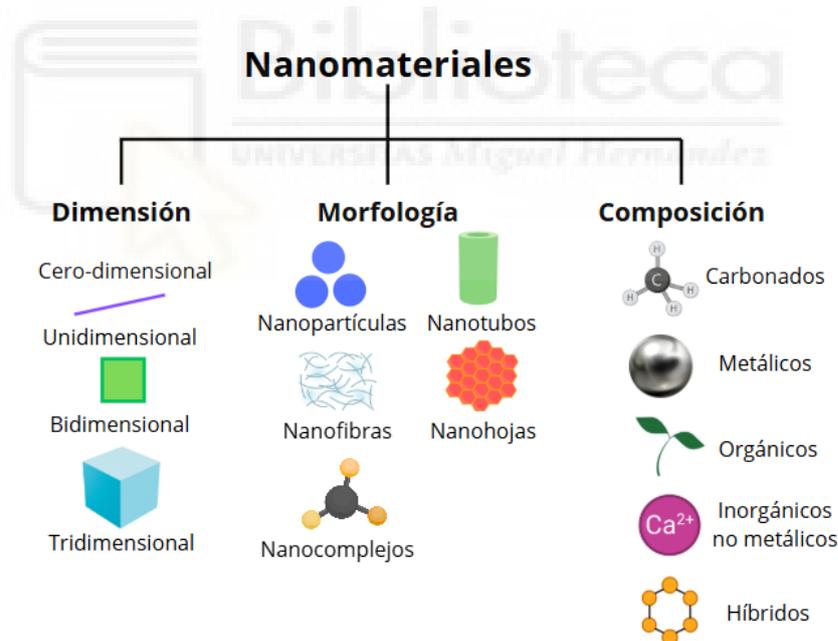


Figura 1. Esquema sobre los tipos de nanomateriales según su disposición, morfología y composición.

1.1.1. Polímeros

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión de un gran número de unidades llamadas monómeros, a través de reacciones conocidas como polimerización [6]. En este caso, nos hemos centrado en el polímero Poli (metil vinil éter-alt-anhídrido maleico) o PMVEMA [7].

1.1.1.1. Poli (metil vinil éter-alt-anhídrido maleico)

El Poli (metil vinil éter-alt-anhídrido maleico) o PMVEMA (**Figura 2**) y sus derivados son polímeros biodegradables con baja toxicidad y alta biocompatibilidad [8,9]. Ha sido utilizado para la encapsulación de fármacos en nanopartículas [9], así como en nanofibras electrohiladas con capacidad de carga, compuestas por mezclas de polímeros [10,11].

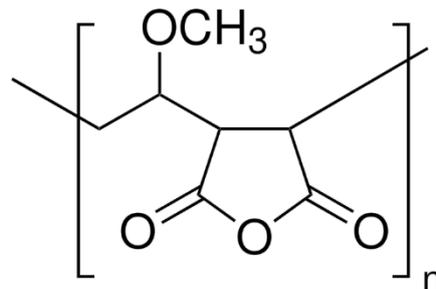


Figura 2. Fórmula química del PMVEMA

1.1.2. Nanofibras poliméricas

Las nanofibras poliméricas se pueden sintetizar utilizando diferentes tecnologías, como la electrohilatura, autoensamblaje, síntesis basada en plantillas, polimerización o síntesis sonoquímica [12]. Entre los diferentes métodos que existen para producirlos, la electrohilatura es el más utilizado porque es simple, barato, versátil, reproducible y escalable [13], por lo que fue el método utilizado en este trabajo.

La electrohilatura consiste en la aplicación de un campo electrostático de alto voltaje a una solución polimérica que fluye a través de una aguja metálica con una velocidad muy baja. Una característica específica de las nanofibras obtenidas es que los parámetros de diseño estructural, como la porosidad, la morfología y el área superficial, pueden ajustarse fácilmente modificando las condiciones ambientales y de procesamiento [14].

Este tipo de síntesis es muy versátil y permite el desarrollo de nanofibras para aplicaciones biomédicas como la encapsulación de fármacos o la bioimagen.

1.2. Bioimagen

Actualmente, los avances en las técnicas de bioimagen nos permiten visualizar procesos y estructuras celulares, tales como la organización de los componentes celulares dentro de las células, cómo interactúan entre sí o como se generan y mueren durante su ciclo vital [15]. La investigación en este campo ha avanzado considerablemente en los últimos años, gracias a los progresos en áreas como la electrónica, la informática y, más recientemente, la nanotecnología. Uno de los logros más importantes ha sido la creación de

sustancias especiales, como las sondas fluorescentes, que permiten observar de forma precisa ciertos procesos y eventos biológicos [16].

En este contexto, la unión entre la química de los polímeros y las técnicas de bioimagen ha adquirido una gran importancia. En los últimos años, esta combinación ha favorecido el desarrollo de nuevas sondas de imagen basadas en polímeros, que muestran un gran potencial tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de distintas enfermedades [17].

Un uso fundamental de las sondas fluorescentes en biología es su aplicación en la detección de la química de elementos y biomoléculas para descifrar sus contribuciones fisiológicas y/o patológicas a los sistemas vivos [18]. La unión de fluoróforos a biomoléculas también permite que se utilicen como guía para cirugías y para la identificación de enfermedades, entre otros. Además, los fluoróforos desempeñan un papel crucial en numerosos kits de diagnóstico [19].

1.2.1. Fluoróforos

Los fluoróforos son moléculas o partes de ellas que emiten fluorescencia. La evaluación de la progresión de una enfermedad requiere la monitorización simultánea de múltiples entidades. Por lo tanto, la observación de procesos biológicos complejos está estrechamente relacionada con el diseño y la síntesis racionales de moléculas fluorescentes y estables en el espectro visible e infrarrojo cercano para proporcionar múltiples canales para el análisis de biomarcadores [20]. Los fluoróforos utilizados para este trabajo fueron la 5-Aminofluoresceína y la 1-Pirenometilamina.

1.2.1.1. 5-Aminofluoresceína

La 5AF es una de las sondas fluorescentes que más se emplean debido a su alta capacidad de absorber la luz en la longitud de onda del láser de argón, 488 nm, gran rendimiento cuántico de fluorescencia y alta foto-estabilidad [21].

La 5AF es un derivado de la fluoresceína que contiene un grupo amino (**Figura 3**). Esta modificación le confiere propiedades fluorescentes únicas y la capacidad de formar enlaces covalentes con otros compuestos, lo que amplía sus aplicaciones en diversos campos científicos y médicos. Se trata de un colorante que se caracteriza por su bajo precio y baja toxicidad, y gracias a su alta absorptividad molar de $77,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ puede ser fácilmente detectada por espectroscopía de absorción y emisión a 494 nm y 519 nm, respectivamente. También se puede utilizar para monitorizar la localización de moléculas biológicamente activas en células vivas [22].

Las características de emisión de este fluoróforo varían significativamente según el medio en el que se encuentre, debido a procesos de transferencia de carga en el estado excitado. En alcoholes la fluorescencia es baja [23,24], mientras que, en disolventes no donantes de enlaces de hidrógeno, como la acetona o el dimetilsulfóxido (DMSO), es más alta [25]. Este comportamiento sugiere que la 5AF puede ser especialmente útil en aplicaciones donde la sensibilidad a las condiciones del entorno es crucial [26].

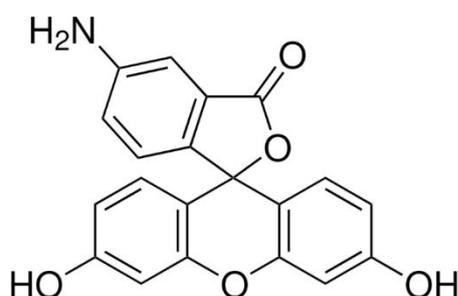


Figura 3. Fórmula química de la 5-Aminofluoresceína.

1.2.1.2. 1-Pirenometilamina

El pireno es uno de los cromóforos más estudiados debido a sus propiedades fotoquímicas, como un alto rendimiento cuántico, bandas de absorción y emisión bien definidas, larga vida útil y capacidad para formar excímeros [27–31].

El Pyr (**Figura 4**) también contiene un grupo amina que le confiere la capacidad de formar enlaces amida con grupos carbonilos activados y es utilizado ampliamente como sonda fluorescente para la detección y el estudio de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. Además es empleada para detectar metales pesados y otros contaminantes en muestras ambientales. El grupo pireno de esta molécula presenta fuertes propiedades de fluorescencia, lo que lo convierte en un detector sensible y selectivo en diversas aplicaciones [32].

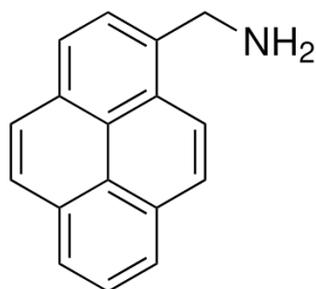


Figura 4. Fórmula química de la 1-Pirenometilamina.

1.2.2. Polímeros fluorescentes

Aprovechando sus diversas funcionalidades y su capacidad de procesamiento en solución, los polímeros sirven como matrices versátiles para la creación de sistemas fluorescentes [20,33–35]. La combinación de fluoróforos orgánicos con polímeros hidrosolubles, polímeros biodegradables o nanoensamblajes poliméricos ha abierto el camino a aplicaciones biomédicas en los campos de las biosondas, la imagenología multicolor y la teranóstica.

Se han desarrollado varios métodos de diseño y síntesis de polímeros fluorescentes. Dentro de estas técnicas encontramos la polimerización de monómeros funcionales que contengan una unidad fluorescente, la utilización de compuestos fluorescentes como iniciador, el uso de compuestos fluorescentes como agentes de transferencia de cadena, la formación de un enlace químico entre grupos fluorescentes y polímeros, y la polimerización de monómeros no fluorescentes funcionales [36].

Al diseñar nanofibras poliméricas conjugadas con fluoróforos, se puede mejorar su fiabilidad y sensibilidad mediante análisis visual e instrumental. Esto se debe a que los fluoróforos modifican la forma en que las nanofibras interactúan con la luz: la absorción produce una pérdida de ciertas longitudes de onda (color percibido como atenuado), mientras que la fluorescencia genera un aumento de intensidad en un rango específico del espectro. Como los fluoróforos emiten luz a longitudes de onda mayores que las que absorben, se pueden usar filtros para eliminar la luz reflejada o dispersada y dejar pasar solo la luz fluorescente emitida. Si el fluoróforo absorbe en el UV y emite en el visible, el ojo humano puede actuar como detector, ya que no percibe la luz UV reflejada pero sí la fluorescencia visible [37].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes

Anteriormente, ya se han realizado investigaciones sobre la síntesis de nanofibras poliméricas con el polímero PMVEMA. Mira y colaboradores [38], del grupo de Diseño y Validación de Nanobiomateriales donde se ha desarrollado este trabajo, ya se ha utilizado el PMVEMA-Es y el PMVEMA-Ac para la síntesis de nanofibras como sistemas de liberación de fármacos. En su caso, se encapsuló ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) y polielectrolitos conjugados fluorescentes, en concreto el bromuro de poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexil] 2,7-(fluoreno)-alt-1,4-fenileno} (HTMA-PFP) y el bromuro de poli-{[9,9-bis(6'-N,N,N trimetilamonio)-hexil]-2,7-(fluoreno)-alt-1,4-(nafto[2,3c]-1,2,5-tiadiazol)} (HTMA-PFNT). Los resultados mostraron que las propiedades fluorescentes de los compuestos no se alteraban y el 5-ALA se logró internalizar en células de cáncer colorrectal y en queratinocitos.

Por otra parte, Yang y colaboradores [39] sintetizaron mediante electrohilado nanofibras fluorescentes con polímeros derivatizados con fluoróforos. Utilizaron el polímero acetato de celulosa y el fluoróforo 9-(Clorometil)antraceno (9-CMA). En su caso, el fluoróforo lo introdujeron en la matriz de la celulosa en lugar de unirlo o ensamblarlo covalentemente al polímero. Los resultados mostraron que el electrohilado es una técnica simple pero efectiva para la síntesis de nanofibras, y que la introducción de las estructuras porosas mejoró significativamente la sensibilidad del sensor.

Finalmente, Fantini y colaboradores [30] también sintetizaron nanofibras poliméricas fluorescentes. Además, compararon distintos tipos de tinciones posibles para ver cómo afectaban al polímero. Tiñeron el polímero PA6 con distintos tintes para su uso en la síntesis de nanofibras mediante electrohilado. Para ello, compararon tres tipos de tinciones: fluoróforos, tintes orgánicos y pigmentos. Disolvieron el PA6 junto al fluoróforo 2-aminoantraceno, tintes orgánicos como azul y naranja disperso y naranja de etilo, y pigmentos como azul cobalto, rojo de cadmio y rojo Marte. En cuanto a los resultados observados en las nanofibras sintetizadas con el polímero con fluoróforo, este último no modificó propiedades del polímero como su tendencia a la formación de aglomerados y filamentos de polímero sólido en la punta de la aguja de electrohilado; la forma y el tamaño del área del sustrato cubierta con nanofibras; la tendencia a producir goteo macroscópico; y la viscosidad de las soluciones. Además, un aumento en la cantidad de fluoróforo añadida se tradujo en cambios de color de las nanofibras y en un aumento en la intensidad de fluorescencia, concluyendo que esta es proporcional al porcentaje de fluoróforo en la solución hasta que se sature.

2.2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es sintetizar y caracterizar nanofibras poliméricas fluorescentes a partir de la funcionalización del polímero PMVEMA con fluoróforos.

2.3. Objetivos específicos

Con el fin de cumplir el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Funcionalización del PMVEMA con 5AF y Pyr para la obtención de polímeros fluorescentes conjugados.
- Caracterización de polímeros conjugados fluorescentes.
- Síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas a partir del biopolímero PMVEMA-Éster.
- Evaluación del efecto citotóxico en líneas de queratinocitos humanos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disolventes

La mayoría de los disolventes y reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louise, EE. UU.). En caso de proceder de otra casa comercial, esta será indicada. Los principales disolventes empleados fueron: etanol (pureza $\geq 99,8\%$), acetona (pureza $\geq 99,9\%$), DMSO (pureza $\geq 99,7\%$), agua Milli-Q®, dimetil formamida (DMF) (pureza $\geq 99,7\%$) y dietiléter (Honeywell, Morristown, EE. UU.) (pureza $\geq 99,8\%$).

El polímero utilizado fue el PMVEMA, ($M_w \sim 156.000$ g/mol, $M_n \sim 80.000$ g/mol). Se trata de un polímero hidrofílico que es biocompatible y posee propiedades bioadhesivas. Para la preparación de nanofibras se utilizó un derivado del PMVEMA, el PMVEMA Éster (PMVEMA-Es), el cual destaca por su biodegradabilidad, biodisponibilidad, biomucoadhesividad, baja toxicidad y precio [40].

Los fluoróforos usados fueron la 5AF (pureza $\geq 95\%$) y el Pyr clorhidrato (pureza $\geq 95\%$).

3.2. Funcionalización del PMVEMA con fluoróforos

La reacción de funcionalización del PMVEMA con ambos fluoróforos se trata de una reacción de apertura de anillo del anhídrido con una amina primaria, formando una imida unida covalentemente al fluoróforo y, en menor proporción, un producto de amida-ácido cuando solo un grupo carbonilo ha reaccionado. Los fluoróforos quedan unidos a través de un grupo amino ($-\text{NH}_2$) que reacciona con el anhídrido del polímero (**Figura 5**).

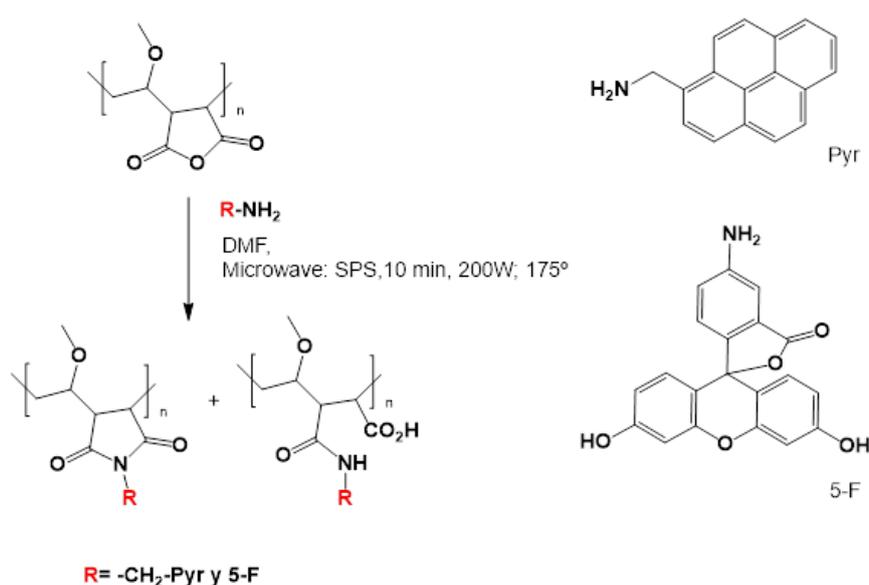


Figura 5. Reacción general de derivatización del PMVEMA con el Pyr y la 5AF

3.2.1. Síntesis con microondas de PMVEMA-5AF

El PMVEMA se funcionalizó empleando 3 concentraciones distintas de fluoróforo (0,25 mmol, 0,5 mmol y 1 mmol) y manteniendo la concentración de 156 mg de PMVEMA fija.

El primer paso fue pesar las cantidades necesarias de PMVEMA y de 5AF. Se añadieron 3 ml de DMF junto al polímero y el fluoróforo en un tubo de ensayo, y se homogenizó. A continuación, se introdujo la disolución en un microondas de síntesis (CEM Corporation, Matthews, EE. UU.) para que se diera la reacción, en condiciones de 200 W y 175 °C durante 10 minutos en modo SPS. Pasado este tiempo, se dejó descender la temperatura hasta los 50 °C para sacar el producto y se observó un cambio de color notable en todos los casos. Posteriormente, el producto se precipitó añadiéndolo gota a gota a un vaso de precipitados con 300 ml de dietiléter en agitación a temperatura ambiente. Después, se filtró empleando un embudo cilíndrico con placa filtrante con grado de porosidad 4 (VidraFoc., Barcelona, España) colocado en un Kitasato conectado una bomba de vacío. Posteriormente, el producto sólido se dejó secando en una estufa durante 24 horas a 60 °C. Pasado este tiempo, pesamos el producto final.

3.2.2. Síntesis con microondas de PMVEMA-Pyr

En este caso, se empleó el fluoróforo clorhidrato de 1-pirenometilamina, por lo que antes de realizar la síntesis se eliminó el hidrocioruro. Para ello, se pesaron 300 mg de fluoróforo y se añadieron 20 ml de dietiléter y 20 ml de hidróxido de sodio para que reaccionara con el hidrocioruro y así eliminarlo. A continuación, se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que se disolvió y se formaron 2 fases, las cuales se separaron con un decantador, quedándonos con la superior (orgánica) que contenía el Pyr. A continuación, se añadió sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de agua y se dejó reposar 5 minutos. Para eliminar el sulfato, se filtró mediante un embudo cilíndrico con placa filtrante con grado de porosidad 4 sobre un Kitasato conectado una bomba de vacío. Posteriormente, el producto líquido se secó en un Rotavapor® R-210 (Büchi®, Flawil, Suiza) a alrededor de 40 °C, y finalmente el producto seco se trasvasó a un vial limpio.

Una vez obtenidos los compuestos sin HCl, se funcionalizaron con PMVEMA siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la 5AF.

3.3. Caracterización de los polímeros funcionalizados

3.3.1. Espectroscopía ultravioleta (UV-Vis)

Se utilizó la técnica de espectroscopía UV-Visible, que es un tipo de espectroscopía de absorción en la que se ilumina una muestra con rayos electromagnéticos de varias longitudes de onda en el rango ultravioleta y visible. Esta técnica se empleó para hacer un

estudio cualitativo y cuantitativo de los copolímeros obtenidos en el proceso de síntesis. Esta técnica permitió tanto saber si había presencia de fluoróforo en el producto final, como conocer la cantidad de fluoróforo que contenía cada muestra analizada. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 10x10 mm y un espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón).

Para calcular la cantidad de fluoróforo presente en el producto final, calculamos el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) a partir de la siguiente fórmula:

$$\epsilon = \frac{A}{l \cdot C}$$

donde A es la absorbancia en el punto máximo, l el paso óptico de la cubeta y C la concentración de fluoróforo en moles por litro. Finalmente se multiplicó el valor de ϵ por la absorbancia y por la concentración en miligramos por mililitro.

La preparación de las disoluciones se realizó mediante diluciones seriadas a distintas concentraciones del copolímero con DMSO.

3.3.2. Espectroscopía de fluorescencia

Para confirmar la eficiencia de la unión polímero-fluoróforo también se empleó la espectroscopía de fluorescencia. La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética y al relajarse al estado basal liberan el exceso de energía en forma de fotones.

Para realizar esta técnica se utilizó un fluorímetro, que consta de una fuente de luz y de un sistema de selección de longitud de onda de excitación. Cuando la muestra es excitada con radiación de energía apropiada emite radiación en todas las direcciones del espacio. La luz emitida es recogida seleccionando una longitud de onda apropiada y conducida a un detector donde queda registrada por sistemas similares a los de un espectrofotómetro de absorción.

En este trabajo, el equipo utilizado fue un espectrofluorímetro de estado estacionario PTI (*Photon Technology International*) QuantaMaster (Model QM-6/2003) (Horiba, Kioto, Japón), cuya fuente de excitación continua es una lámpara de Xenón. Posee como accesorios dos polarizadores (Glan-Thompson) motorizados para los canales de excitación y emisión. Para medir la fluorescencia de las muestras se utilizaron cubetas de 10x10 mm.

La preparación de las muestras consistió en disolver los copolímeros en DMSO a la concentración a la que el pico de máxima absorción obtenido mediante espectroscopía UV-Vis se encontraba a un valor alrededor de 0,1 o inferior.

3.3.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para hacer un estudio cualitativo de los grupos funcionales que constituyen las muestras de las síntesis realizadas se hizo un análisis mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*). Esta técnica se basa en la capacidad de las moléculas de absorber radiación infrarroja a una determinada longitud de onda, ya que los subestados de rotación y modos de vibración de estas están excitados provocando un cambio en su momento dipolar. Por lo tanto, asignando absorbancias a grupos funcionales específicos, obtendremos un espectro diferente de infrarrojo para cada molécula.

El equipo usado fue un espectrofotómetro Spectrum Two FT-IR (PerkinElmer, Waltham, EE. UU.). Para el procesamiento de los datos, los registros se realizaron en modo transmisión con 32 barridos en un rango entre 4000 y 500 cm^{-1} .

La preparación de las muestras consistió en la producción de pastillas de bromuro potásico (KBr) mezclado con las sustancias a analizar.

3.4. Síntesis de nanofibras

3.4.1. Preparación de las disoluciones

El primer paso de la síntesis de nanofibras fue la preparación de las disoluciones. En el caso de la 5AF se utilizó el polímero PMVEMA-ES ($M_w = 130000 \text{ g/mol}$) a una concentración del 27 % p/p. La concentración elegida se basó en estudios previos del grupo de investigación que empleaban el mismo polímero para la elaboración de fibras.

El polímero se disolvió en etanol en un vial y se dejó agitando a 200 rpm hasta conseguir una disolución homogénea. Una vez disuelto, se añadieron los copolímeros fluorescentes de las distintas concentraciones a las disoluciones a concentraciones del 5 % y 1 % con respecto al peso del polímero, ya que son las concentraciones mínimas a las que se observó fluorescencia en las fibras.

3.4.2. Electrohilatura

La técnica de la electrohilatura utilizada consistió en cargar una jeringuilla de 2 ml, procedente de Becton Dickinson Discardit (Huesca, España), con la disolución polimérica, y posteriormente colocar en el extremo de la jeringuilla una aguja de acero inoxidable 316 de 10,16 cm de longitud, con un diámetro interno de 0,838 mm y externo de 1,27 mm (Sigma Aldrich). A continuación, se colocó la jeringuilla en la bomba de infusión, la cual aplica un flujo constante de eyección en dirección a un colector de aluminio al que previamente se le había adherido un portaobjetos proporcionado por Deltalab (Barcelona, España). Este colector se

encontraba situado a una distancia concreta de la jeringuilla, y tanto el colector como la aguja se conectaron a la fuente de voltaje. Esta aplicaba un campo electrostático entre la aguja y el colector, gracias a la aplicación de un voltaje determinado. Todo este proceso tuvo lugar dentro de una caja de metracrilato por seguridad.

A medida que aumentaba el voltaje, la gota en la punta de la aguja empezaba a deformarse hasta que comenzaba a ejercer una magnitud de fuerza, como la superficie de tensión de la propia solución. En este momento, una forma de cono con lados convexos y una punta redondeada, conocido como cono de Taylor, comenzaba a formarse. Cuando se alcanzaba un cierto umbral de voltaje, un chorro de líquido comenzaba a emitirse. Durante el movimiento del chorro entre la aguja y el colector, el solvente se evaporaba y se recogía una fibra polimérica sólida (**Figura 6**).

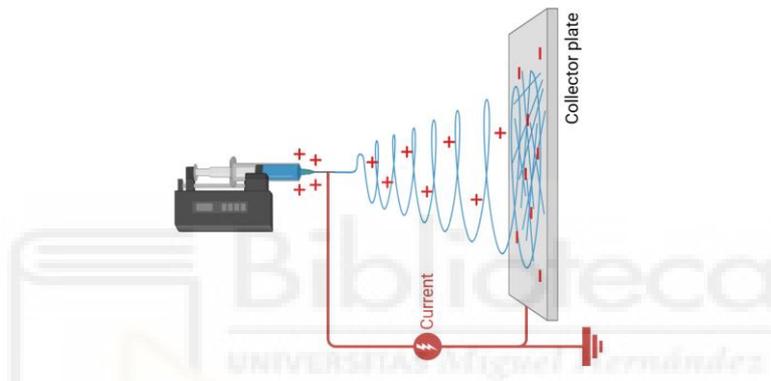


Figura 6. Proceso de electrohilatura.

El equipo utilizado fue una fuente de voltaje modelo FC60P2 (Glassman High Voltage Inc., Nueva Jersey, EE. UU.) y una bomba de infusión modelo KdScientific-100-CE (KD Scientific, Holliston, EE. UU.). Este equipo permitió modificar el flujo de eyección de la disolución y el voltaje. El último parámetro modificable era la distancia entre el colector y la jeringa. Las condiciones ambientales como son la temperatura y la humedad también influyeron en este procedimiento, estando entre 20-30 °C y 35-50 % respectivamente.

3.4.2.1. Parámetros de electrohilatura

Como se ha comentado anteriormente, los tres parámetros modificables son el voltaje, el flujo y la distancia entre la jeringa y el colector. En el caso del PMVEMA-Es, los parámetros utilizados fueron de 6,8 kV; 0,25 ml/h; y 10 cm, respectivamente.

3.5. Caracterización de las nanofibras

Para el estudio de la forma de las nanofibras, se utilizó tanto la microscopía óptica como la microscopía electrónica en los portaobjetos que habían sido situados en el colector durante el proceso de electrohilatura.

3.5.1. Microscopía óptica

Tras la síntesis de las nanofibras, se observaron en un microscopio óptico provisto de distintos filtros de microscopía para así conocer si los parámetros utilizados para electrohilar eran los adecuados, si había defectos morfológicos visibles y si las nanofibras eran fluorescentes.

El equipo utilizado fue un microscopio óptico Mycosystems DMI 3000B (LEICA, Bensheim, Alemania), provisto con una cámara digital LEICA DFC 3000G y una fuente de luz compacta EL6000. El programa informático empleado fue el Leica Application Suite AF 6000 Module Systems y las imágenes se realizaron a 40x. El filtro utilizado fue el LEICA L5, el cual tiene un rango de emisión de 527/30 nm y un punto máximo de excitación en 480/40 nm. Por otra parte, las fibras también fueron observadas en contraste de fases.

3.5.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Para observar las nanofibras con mayor detalle y conocer su diámetro se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, *Field Emission Scanning Electron Microscopy*). Este instrumento utiliza un haz de electrones de alta energía sobre una superficie sólida, obteniendo de esta forma una señal en forma de imagen. Los portaobjetos que contenían las nanofibras fueron cubiertos con cromo para aumentar su conductividad, evitando así la acumulación de carga electrostática, lo cual puede distorsionar la imagen. El equipo que se utilizó fue el modelo Sigma 300 VP de ZEISS de emisión de campo de cátodo caliente Schottky (ZEISS, Oberkochen, Alemania).

Una vez obtenidas las imágenes, se midieron 100 nanofibras mediante el programa informático ImageJ, desarrollado por el Instituto Nacional de la Salud (Bethesda, MD, EE. UU.). Para ello, se ajustaba la escala en cada imagen y se almacenaban los datos en el programa informático Microsoft Excel 2021 (Redmond, WA, EE. UU.). Posteriormente, se calculó el coeficiente de variación (CV) a partir de la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

donde σ es la desviación típica y \bar{x} es la Media.

3.5.3. Microscopía confocal de fluorescencia

Para observar las nanofibras en alta resolución utilizamos la microscopía confocal, que escanea la muestra con un haz de láser y un sistema de detección que selecciona la luz proveniente de un plano focal específico, rechazando la luz fuera de foco. Esto permite visualizar detalles microscópicos con mayor claridad que la microscopía óptica convencional y obtener imágenes tridimensionales.

El equipo utilizado fue un microscopio confocal LSM900 con Airyscan 2 de ZEISS (ZEISS, Oberkochen, Alemania). La intensidad de fluorescencia se registró a la longitud de onda de emisión de 590 nm, con una longitud de excitación de 480 nm.

3.6. Cultivos celulares

3.6.1. Ensayo de Citotoxicidad MTT

Para el estudio *in vitro* preliminar del efecto citotóxico de los copolímeros de PMVEMA-Es con 5AF o Pyr se utilizaron las líneas celulares HaCaT de queratinocitos humanos. Se utilizaron los lotes #3 en ambos casos, debido a que no se observaron diferencias significativas en cuanto a las propiedades generales entre los diferentes lotes.

Las líneas HaCaT se cultivaron en medio de cultivo DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) rico en glucosa, con glutamina estable 2 mM, Hepes 25 mM (Biowest®, Riverside, EE. UU.), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Biowest®) y 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomina) (Biowest®). Las condiciones de cultivo fueron 37 °C con CO₂ al 5 % y atmósfera humidificada en incubador (ESCO Lifesciences GmbH, Friedberg, Alemania).

La posible citotoxicidad de los copolímeros se analizó midiendo los cambios en la viabilidad celular mediante un ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo se basa en el cambio de color de amarillo a morado que experimenta el MTT cuando es reducido, por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, y transformado en una sal de formazán ((E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán). Al final del tratamiento, la cantidad de compuesto, y por tanto su señal colorimétrica, es proporcional a las células viables en cultivo.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 12000 células por pocillo. Tras 24 h de incubación con los copolímeros, se añadió el reactivo MTT a una concentración final de 0,5 mg/mL por 1,5 h. A continuación, se sustituyó el contenido de cada pocillo por 200 µL de DMSO y se agitó durante 30 min para disolver los cristales de formazán. Finalmente, la absorbancia fue medida a 570 nm y a 630 nm en un lector de placas Gen5™ (BioTeK®, Winooski, VT, EE. UU.). Cada tratamiento se realizó por sextuplicado. La densidad óptica se correlacionó directamente con la cantidad de células y se expresó en porcentajes relativos al grupo control.

3.7. Análisis de datos

Los datos obtenidos se muestran como la media ± desviación estándar. Para los ensayos en placas de 96 pocillos se utilizó una n mayor o igual a 6 ($n \geq 6$). Para todos estos análisis y sus respectivas representaciones se utilizó GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, EE.

UU). Las comparaciones estadísticas se calcularon empleando un ANOVA de dos vías. Las diferencias estadísticamente significativas se representan marcadas con * si el p-valor < 0,05, ** si el p-valor < 0,01, *** si el p-valor < 0,001 y **** si el p-valor < 0,0001.



4. RESULTADOS

4.1. Síntesis y caracterización del PMVEMA-5AF y PMVEMA-Pyr

4.1.1. Espectros de emisión UV-Vis

La espectroscopía UV-Visible se utilizó para determinar la presencia de fluoróforo en el producto obtenido tras el proceso de síntesis. El PMVEMA-5AF muestra un pico de absorción máxima en 517 nm, mientras que el PMVEMA-Pyr muestra varios picos, siendo el más importante el de 345 nm.

En las gráficas representadas en la **Figura 7** observamos picos de absorción similares al control del fluoróforo sin conjugar, representados con líneas punteadas en ambas gráficas, tanto en 5AF y como en Pyr en los tres lotes, por lo que concluimos que en todos los casos había fluoróforo enlazado con el polímero. El PMVEMA, por sí solo, no presenta absorción entre longitudes de onda comprendidas entre los 300 y 800 nm, por lo que los picos obtenidos en el espectro pertenecen al fluoróforo.

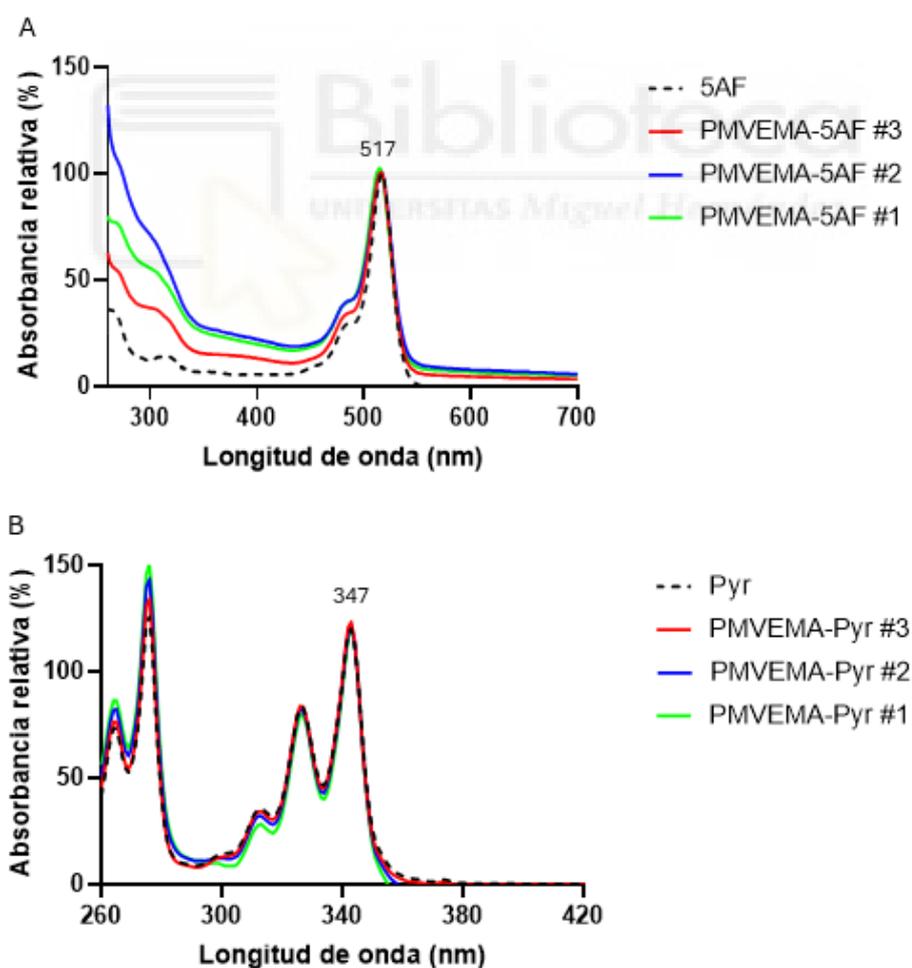


Figura 7. Espectro de absorción del PMVEMA funcionalizado con fluoróforos a distintas concentraciones. (A) PMVEMA-5AF. (B) PMVEMA-Pyr.

A partir de los espectros de absorción, y basándonos en el coeficiente de extinción molar de la 5AF y del Pyr, $46298 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $23241 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente, se calculó la cantidad de fluoróforo presente en los productos finales, así como el rendimiento de las reacciones llevadas a cabo, con un rendimiento promedio superior al 50 % en todos los casos (Tabla 1).

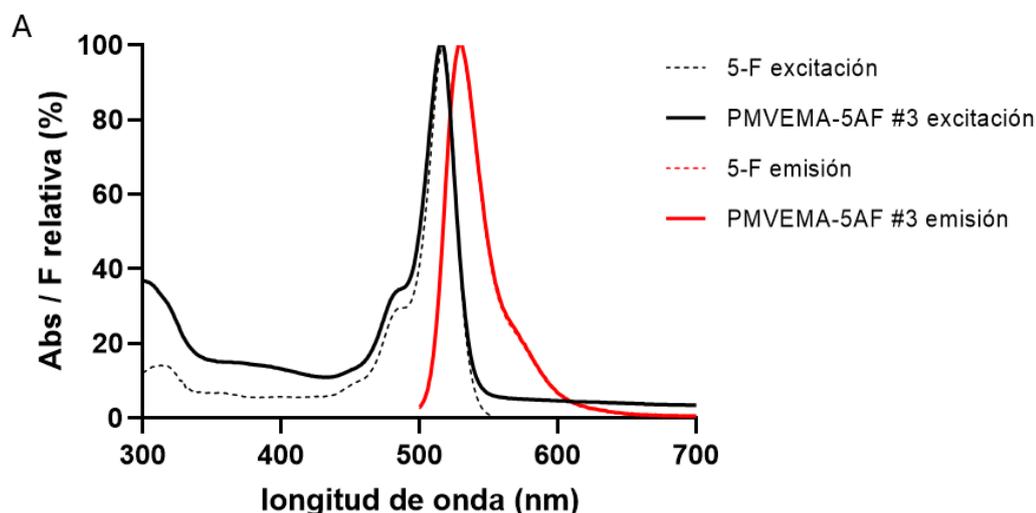
Tabla 1. Resultados de las reacciones de síntesis de los copolímeros PMVEMA-5AF y PMVEMA-Pyr.

COMPUESTO	LOTE	[FLUORÓFORO] (mmol/ml)	[PMVEMA] (mmol/g)	CANTIDAD (%)	RENDIMIENTO (%)	COLOR
PMVEMA-Pyr	#3	1	$1,43 \pm 0,06$	38	62	azul
	#2	0,5	$1,09 \pm 0,10$	29	48	malva
	#1	0,225	$0,98 \pm 0,10$	26	56	rosa
PMVEMA-5AF	#3	1	$1,74 \pm 0,80$	61	68	naranja
	#2	0,5	$1,38 \pm 0,69$	48	53	ocre
	#1	0,25	$1,20 \pm 0,68$	42	54	ocre

4.1.2. Espectroscopía de fluorescencia

A partir de las longitudes de absorbanza de ambos fluoróforos obtenidas mediante espectroscopía UV-Vis, excitamos las muestras a dichas longitudes de onda y obtuvimos los espectros de fluorescencia representados en la Figura 8. En el caso de la 5-Aminofluoresceína, la longitud de onda de excitación fue de 517 nm, mientras que con la 1-Pirenometilamina fue de 347 nm.

En el espectro de fluorescencia del PMVEMA-5AF, obtuvimos un pico máximo en 529 nm, tanto en el copolímero como en el control de fluoróforo sin conjugar. En el PMVEMA-Pyr, por otra parte, el pico máximo se encuentra en 374 nm, igual que en su estado no conjugado. En la Figura 8 los espectros de emisión de ambos copolímeros se encuentran desplazados hacia longitudes de onda mayores, de 517 a 529 nm en la 5AF y de 347 a 374 nm en el Pyr.



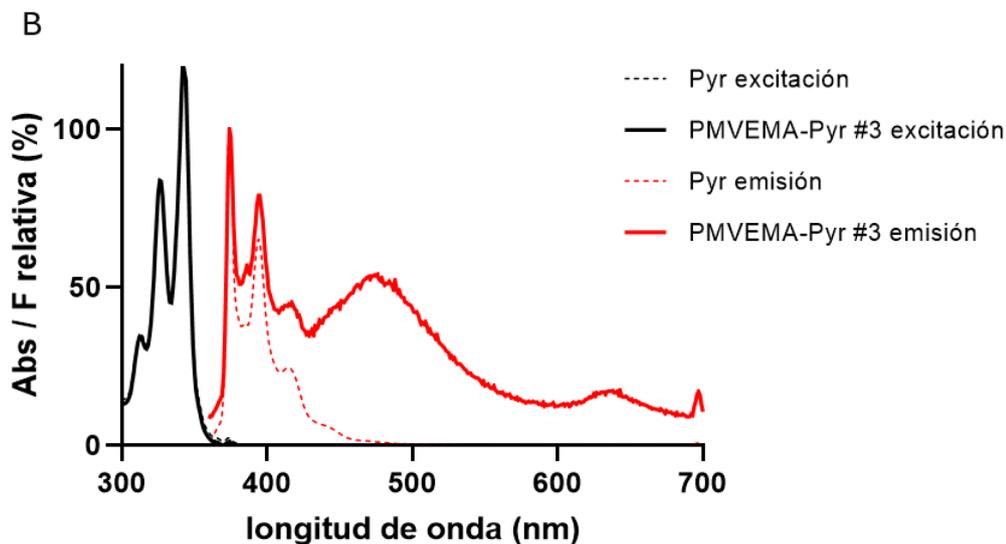


Figura 8. Comparación de los espectros de excitación en negro y los de emisión en rojo, siendo las líneas punteadas los controles de los fluoróforos libres y las líneas continuas los copolímeros. (A) PMVEMA-5AF. (B) PMVEMA-Pyr.

4.1.3. Espectroscopía FT-IR

Esta técnica se empleó para evaluar la estructura y la composición final de la molécula obtenida (**Figura 9**). En el caso de la 5AF (A), el espectro del producto PMVEMA-5AF presenta características combinadas del PMVEMA y de la 5AF. En 1850 cm^{-1} se ve una reducción de la banda del PMVEMA, y entre 1800 y 1700 cm^{-1} se observan en el copolímero grupos C=O comunes al polímero, pero se ve una disminución de la intensidad o desplazamiento de las bandas. Por otra parte, en la región de 1650 - 1600 cm^{-1} observamos bandas comunes a la 5AF. Alrededor de 1850 cm^{-1} observamos una reducción de la banda.

En el caso del Pyr (B), también se muestran características comunes a ambos componentes en el PMVEMA-Pyr. En la región comprendida entre 1800 y 1700 cm^{-1} también se observan grupos carbonilo desplazados comunes entre el copolímero y el PMVEMA, además de la reducción de la banda del PMVEMA alrededor de 1850 cm^{-1} . En la región aromática de 1600 - 1450 cm^{-1} se observan nuevas bandas aromáticas o señales más intensas.

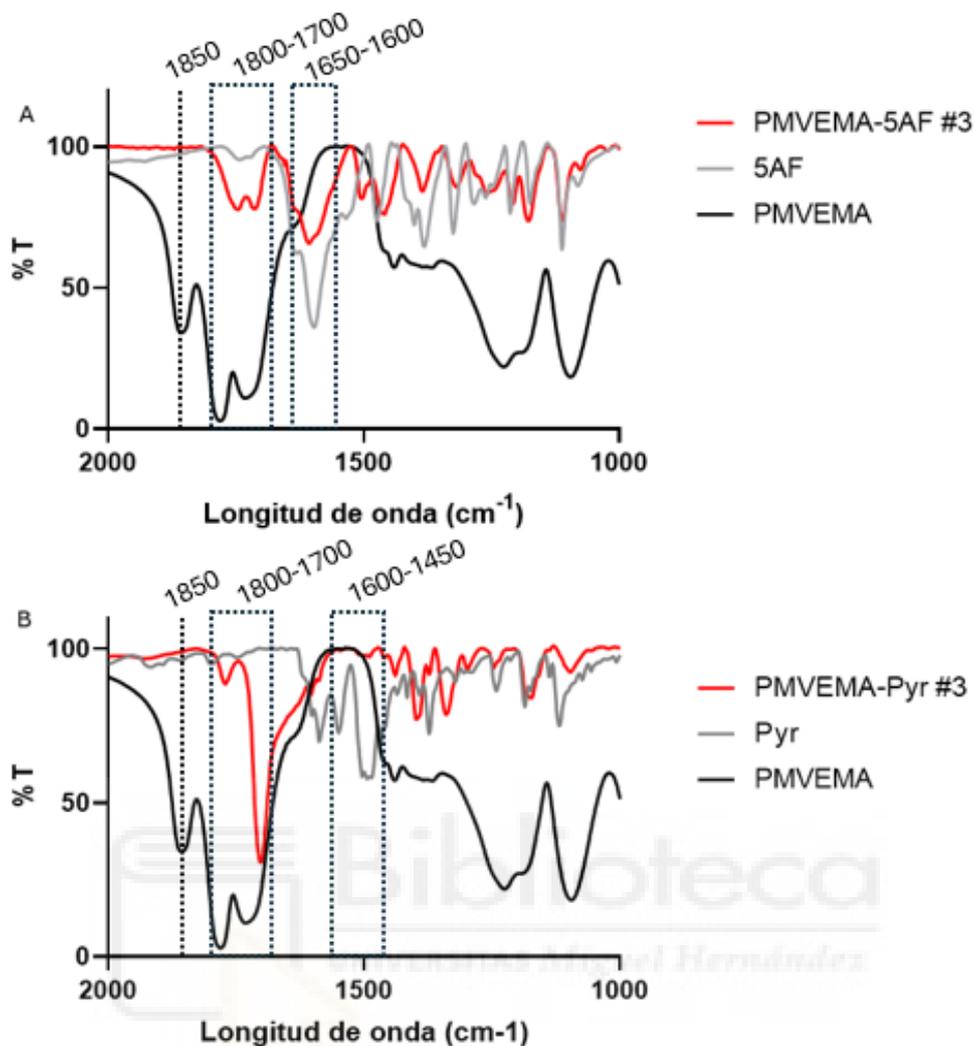


Figura 9. Espectros de FTIR de los copolímeros. (A) PMVEMA-5AF #3. (B) PMVEMA-Pyr #3. Las áreas punteadas destacan rangos de longitud de onda que muestran diferencias entre espectros.

4.2. Caracterización de las nanofibras con PMVEMA-fluoróforo

4.2.1. Microscopía óptica

Tras electrohilar los copolímeros con PMVEMA-Es, las nanofibras sintetizadas con 5AF pudieron ser observadas mediante microscopía óptica de fluorescencia. En primer lugar, se electrohilaron las nanofibras con una concentración de copolímero al 5% con respecto al peso del PMVEMA-Es.

La única diferencia observada entre las nanofibras de los distintos lotes fue una disminución de la fluorescencia en concentraciones menores de fluoróforo. No obstante, las distintas concentraciones de fluoróforo no afectaron a la síntesis de las fibras.

Posteriormente, se electrohilaron nanofibras de PMVEMA-Es con una concentración de copolímero del 1 % con respecto al peso del polímero.

Se puede observar una disminución en la intensidad de la fluorescencia entre las nanofibras sintetizadas al 5 % con 5AF y las sintetizadas al 1 %, debido a una menor concentración de fluoróforo en la disolución inicial (**Figura 11**).

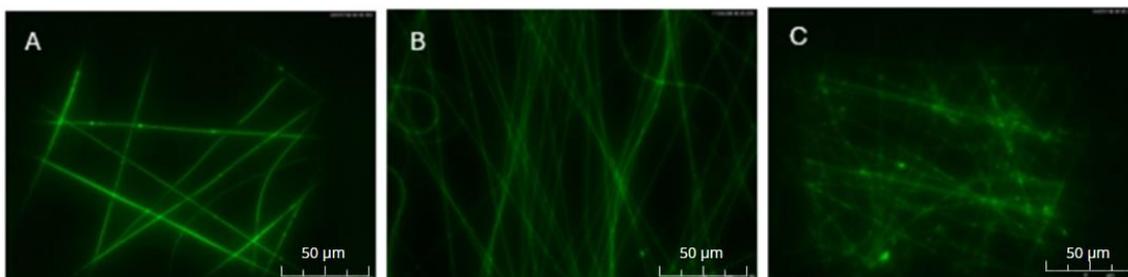


Figura 10. Fotografías de las nanofibras sintetizadas con PMVEMA-5AF #3 y PMVEMA-Pyr #3 obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia (escala 50 µm). (A) PMVEMA-5AF con 5 % de 5AF respecto al PMVEMA. (B) PMVEMA-5AF con 1 % de 5AF respecto al PMVEMA. (C) PMVEMA-Pyr con 5 % de 5AF respecto al PMVEMA.

4.2.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Las nanofibras de PMVEMA-5AF fueron observadas mediante microscopía FESEM para conocer su diámetro. Se observaron nanofibras uniformes y sin defectos visibles, con un diámetro medio de 1040 ± 243 nm, y un CV del 23,36 %. Por otra parte, las nanofibras de PMVEMA-Pyr eran mayoritariamente dobles. Su diámetro medio fue de $1672 \pm 21,03$ nm debido a que la mayoría de las fibras obtenidas eran dobles, con un CV de 12,39 % (**Figura 10**).

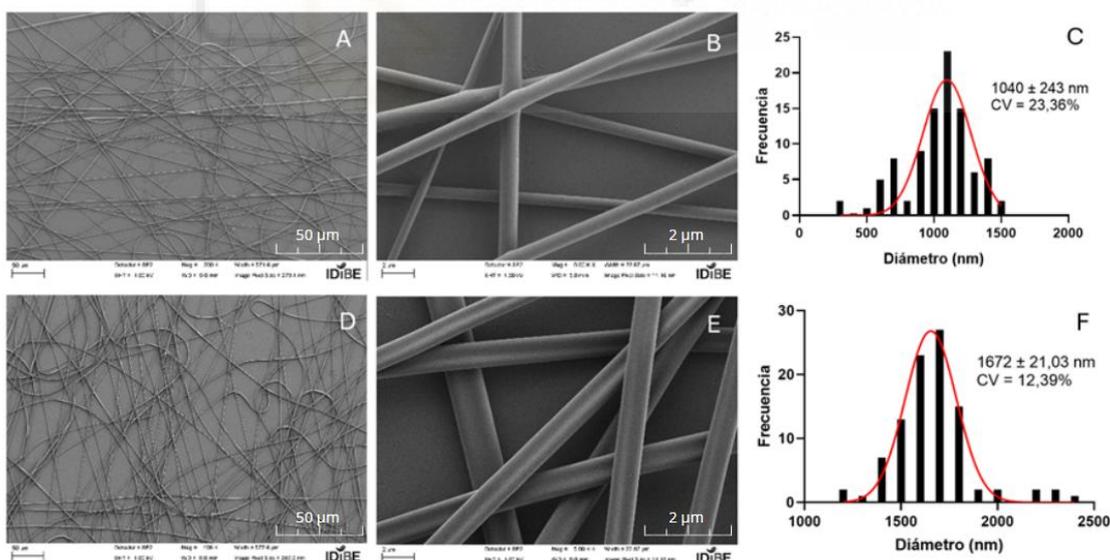


Figura 11. Análisis de las nanofibras de PMVEMA-5AF #3 y PMVEMA-Pyr #3 al 1 % con respecto al peso del PMVEMA-Es mediante microscopía FESEM. (A) Nanofibras de PMVEMA-5AF #3 (escala 50 µm). (B) Nanofibras de PMVEMA-5AF #3 (escala 2 µm). (C) Histograma de frecuencia de diámetros de las nanofibras de PMVEMA-5AF #3. (D) Nanofibras de PMVEMA-Pyr #3 (escala 50 µm). (E) Nanofibras de PMVEMA-Pyr #3 (escala 2 µm). (F) Histograma de frecuencia de diámetros de las nanofibras de PMVEMA-Pyr #3.

4.2.3. Microscopía correlativa

Las nanofibras fueron observadas también mediante microscopia confocal de fluorescencia y se superpusieron las imágenes con las obtenidas mediante FESEM. Se observó una distribución homogénea de la fluorescencia a lo largo de las nanofibras (**Figura 12**).

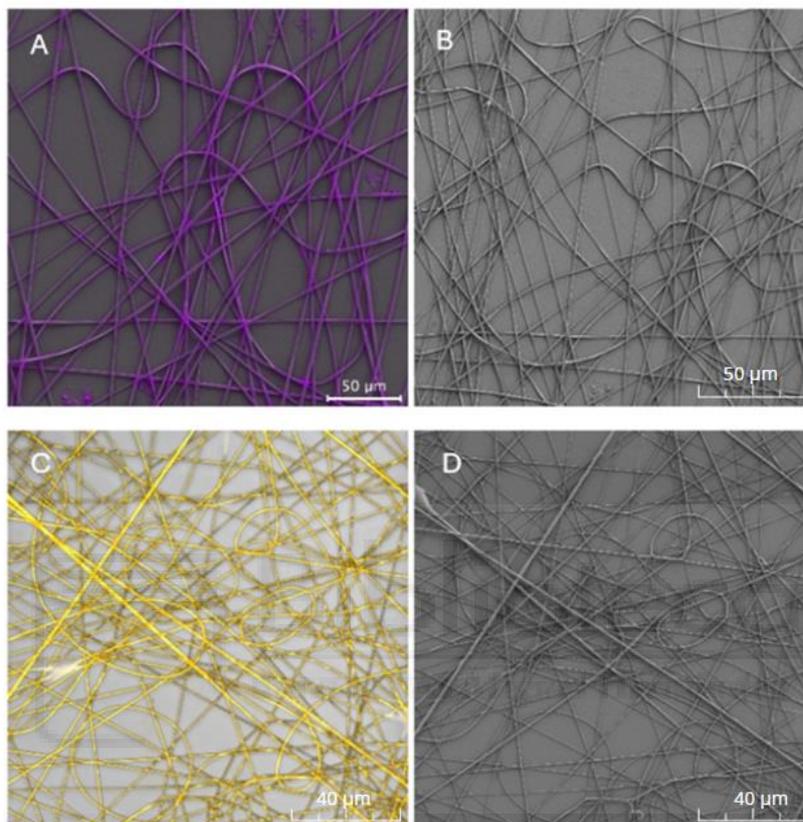


Figura 12. Fotografías correlativas de las nanofibras. (A) Imagen correlativa de las nanofibras de PMVEMA-5AF #3 de FESEM y microscopio confocal (Escala 50 μm). (B) Imagen FESEM de las nanofibras de PMVEMA-5AF #3 (Escala 50 μm). (C) Imagen correlativa de las nanofibras de PMVEMA-Pyr #3 de FESEM y microscopio confocal (Escala 40 μm). (D) Imagen de FESEM de las nanofibras de PMVEMA-Pyr #3 (Escala 40 μm).

4.3. Ensayos celulares

Se estudió el efecto de los copolímeros sobre la viabilidad de la línea celular HaCaT en un rango de concentraciones entre 1,9 y 250 mg/ml. Tras 24 h de tratamiento, ni el PMVEMA-Pyr ni el PMVEMA-5AF mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (**Figura 13**). La viabilidad en el caso del PMVEMA-5AF osciló entre el 80 y 100 % mientras que con el PMVEMA-Pyr fue prácticamente del 100 % en todos los casos, por lo que no hubo ningún efecto sobre la viabilidad celular.

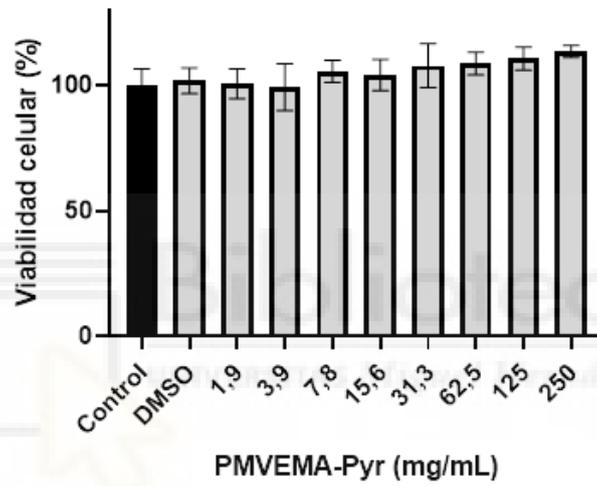
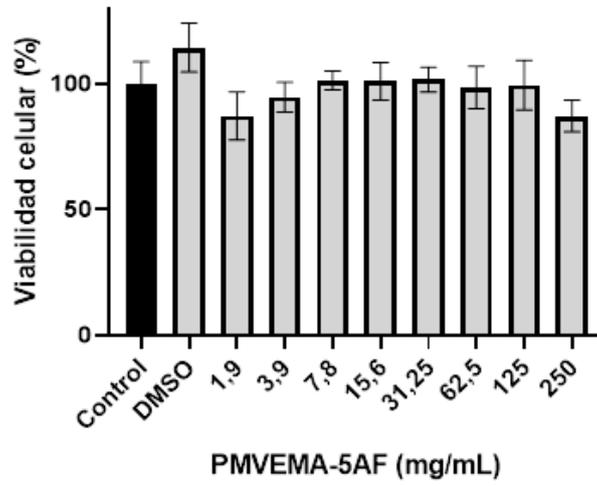


Figura 13. Resultados de MTT en las líneas HaCaT tras tratamiento con PMVEMA-5AF y PMVEMA-Pyr.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como objetivo la funcionalización del polímero PMVEMA con distintos fluoróforos para la síntesis y posterior caracterización de nanofibras poliméricas fluorescentes.

Inicialmente, se prepararon disoluciones poliméricas funcionalizando el PMVEMA con los fluoróforos Pyr y 5AF mediante síntesis en reactor microondas. Los resultados de las reacciones mostraron que una concentración inicial mayor de fluoróforo implica una mayor cantidad de fluoróforo funcionalizado, así como un rendimiento mayor de la reacción. Además, el color del producto obtenido dependía de la cantidad de fluoróforo inicial. En el caso del PMVEMA-5AF tenía un mayor grado de funcionalización y mayor rendimiento que el PMVEMA-Pyr, lo cual podría deberse a una mejor reactividad de la amina del 5AF con el anhídrido del polímero. Estos resultados se ajustan a los obtenidos por los investigadores Fantini y colaboradores [37], mostrando que un aumento en la cantidad de fluoróforo añadido a la disolución se traducía en cambios de color de las nanofibras del polímero PA6 y en un aumento en la intensidad de fluorescencia. Los autores concluyeron que este aumento es proporcional al porcentaje de fluoróforo en la solución hasta llegar un punto en que se satura.

Posteriormente se caracterizaron los copolímeros mediante espectroscopía UV-Vis, de fluorescencia e infrarroja. La espectroscopía UV-Vis fue utilizada para comprobar que había fluoróforo presente en el producto obtenido. Tanto el PMVEMA-Pyr como el PMVEMA-5AF presentaban puntos máximos de absorción en las mismas longitudes de onda que los controles de fluoróforo sin polímero, concretamente en 345 y 517 nm, respectivamente, concluyendo así que los copolímeros contenían el fluoróforo y que sus propiedades de emisión no habían sido alteradas.

En cuanto a la caracterización mediante espectroscopía de fluorescencia, se excitó a 517 nm el PMVEMA-5AF y a 347 nm el PMVEMA-Pyr y se observó que los espectros de emisión de ambos copolímeros se encontraban desplazados hacia longitudes de onda mayores: de 517 a 529 nm en PMVEMA-5AF y de 347 a 374 nm en PMVEMA-Pyr. Esto se conoce como desplazamientos de Stokes, que se definen como la diferencia entre la longitud de onda de la luz absorbida por una molécula y la longitud de onda de la luz que emite después de haber sido excitada [41].

Para terminar con la caracterización de los copolímeros, se utilizó la espectroscopía FTIR para estudiar la estructura y la composición final de las moléculas de los copolímeros. Tanto en el PMVEMA-Pyr como en el PMVEMA-5AF, el espectro del copolímero presenta características combinadas del polímero y del fluoróforo. Entre 1800 y 1700 cm^{-1} se observan en los copolímeros grupos C=O comunes al polímero, pero se ve una disminución de la intensidad o desplazamiento de las bandas alrededor de 1850 cm^{-1} , lo que indica interacción

entre los carbonilos de los polímeros y el grupo funcional de los fluoróforos, posiblemente por la formación de la banda amida o imida. La reducción o desaparición de algunas bandas del 5AF y Pyr puros puede indicar que ciertos grupos funcionales han reaccionado, como $-NH_2$, al formar el enlace con PMVEMA. Por otra parte, en la región de $1650-1600\text{ cm}^{-1}$ en el caso del PMVEMA-5AF se observaron bandas comunes a la 5AF, lo que indica la presencia tanto del polímero como del fluoróforo en el producto final. Mientras que en la región aromática de $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ en el caso del PMVEMA-Pyr también se observan nuevas bandas aromáticas o señales más intensas, lo que indicaría la incorporación de Pyr al polímero.

Tras caracterizar los copolímeros, se sintetizaron las nanofibras mediante electrohilatura. Las nanofibras obtenidas fueron caracterizadas mediante microscopía óptica de fluorescencia, confocal y FESEM. En ambos casos se comprobó que las nanofibras eran fluorescentes y que la fluorescencia disminuía con la concentración de fluoróforo en el copolímero y con el porcentaje de copolímero añadido a la solución de PMVEMA-Es y etanol. Además, la distribución era homogénea a lo largo de la fibra lo cual confirma que se solubilizó en su totalidad. Por tanto, se concluyó que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo presente, y que el PMVEMA no afectaba a las propiedades fluorescentes de los compuestos. La microscopía FESEM fue utilizada para estudiar la morfología de las nanofibras y medir su diámetro. En el caso del PMVEMA-5AF, se obtuvieron nanofibras uniformes con un diámetro medio de $1040 \pm 243\text{ nm}$, con un CV del 23,36 %. Por otra parte, las nanofibras de PMVEMA-tenían un diámetro medio de $1672 \pm 21,03\text{ nm}$ debido a que la mayoría de las fibras obtenidas eran dobles, con un CV de 12,39 %. El CV muestra la variabilidad que hay en un experimento, considerándose alta generalmente si supera el 30 %. En ambos casos es menor al 30 %, por lo que las nanofibras no presentaban alta variabilidad entre sus diámetros.

Finalmente, se estudió la capacidad citotóxica de los copolímeros mediante ensayos MTT en queratinocitos humanos (HaCaT) en un rango de concentraciones entre 1,9 y 250 mg/ml. Tras realizar los experimentos, dado que no se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con los copolímeros y los controles, se concluyó que no presentan efectos citotóxicos a ninguna concentración.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

Las conclusiones extraídas de este trabajo fueron las siguientes:

- Se funcionalizó el polímero PMVEMA con los fluoróforos Pyr y 5AF a concentraciones de 0,25 mmol, 0,5 mmol y 1 mmol, mediante reacciones en un microondas de síntesis.
- Se comprobó mediante espectroscopía UV-Vis, de fluorescencia y FTIR que la funcionalización había sido exitosa y que las propiedades fluorescentes de los fluoróforos no habían sido alteradas.
- Se estableció que a mayor concentración inicial de fluoróforo, mayor cantidad de fluoróforo funcionalizado y mayor rendimiento de la reacción.
- La amina de la 5AF reaccionó de forma más eficiente con el anhídrido del PMVEMA que el Pyr.
- Se sintetizaron nanofibras a partir de PMVEMA-Es con los copolímeros a una concentración del 5 % y 1 % con respecto al peso del PMVEMA-Es con la técnica de electrohilatura.
- Se observaron las nanofibras comprobando que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo presente, y que el PMVEMA no afectaba a las propiedades fluorescentes de los fluoróforos.
- Se observó que en ambos casos las nanofibras eran uniformes, con una tendencia a formar nanofibras dobles en el PMVEMA-Pyr. En ambos casos el CV fue menor al 30%, por lo que las nanofibras no presentaban alta variabilidad entre sus diámetros.
- Los copolímeros no mostraron citotoxicidad en líneas de queratinocitos humanos en concentraciones entre 1,9 y 250 mg/ml.

El copolímero de PMVEMA-fluoróforo demostró poder aplicarse en la fabricación de nanomateriales poliméricos como las nanofibras sin alterar las propiedades de estos compuestos, lo cual sugiere que es un polímero fluorescente prometedor para aplicaciones en bioimagen. Así mismo, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular de queratinocitos humanos. En futuras investigaciones, se estudiarán las propiedades de fluorescencia de las nanofibras sintetizadas en estado sólido. Por otro lado, se evaluará el efecto de las nanofibras fluorescentes en modelos celulares para estudiar su aplicación en bioimagen.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gajanan, K.; Tijare, S.N. Applications of Nanomaterials. *Mater Today Proc* **2018**, *5*, 1093–1096, doi:10.1016/j.matpr.2017.11.187.
2. Sharifi, S.; Behzadi, S.; Laurent, S.; Laird Forrest, M.; Stroeve, P.; Mahmoudi, M. Toxicity of Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2323–2343, doi:10.1039/C1CS15188F.
3. Saleh, T.A. Nanomaterials: Classification, Properties, and Environmental Toxicities. *Environ Technol Innov* **2020**, *20*, 101067, doi:10.1016/j.eti.2020.101067.
4. Saha, S.; Bansal, S.; Khanuja, M. Classification of Nanomaterials and Their Physical and Chemical Nature. In *Nano-enabled Agrochemicals in Agriculture*; Elsevier, 2022; pp. 7–34 ISBN 9780323910095.
5. Joudeh, N.; Linke, D. Nanoparticle Classification, Physicochemical Properties, Characterization, and Applications: A Comprehensive Review for Biologists. *J Nanobiotechnology* **2022**, *20*, 262, doi:10.1186/s12951-022-01477-8.
6. George Odian *Principles of Polymerization*; 4th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2004;
7. Pires, P.C.; Mascarenhas-Melo, F.; Pedrosa, K.; Lopes, D.; Lopes, J.; Macário-Soares, A.; Peixoto, D.; Giram, P.S.; Veiga, F.; Paiva-Santos, A.C. Polymer-Based Biomaterials for Pharmaceutical and Biomedical Applications: A Focus on Topical Drug Administration. *Eur Polym J* **2023**, *187*, 111868, doi:10.1016/j.eurpolymj.2023.111868.
8. Chhabra, H.; Gupta, P.; Verma, P.J.; Jadhav, S.; Bellare, J.R. Gelatin-PMVE/MA Composite Scaffold Promotes Expansion of Embryonic Stem Cells. *Materials Science and Engineering C* **2014**, *37*, 184–194, doi:10.1016/j.msec.2013.12.033.
9. Iglesias, T.; Dusinska, M.; El Yamani, N.; Irache, J.M.; Azqueta, A.; López de Cerain, A. In Vitro Evaluation of the Genotoxicity of Poly(Anhydride) Nanoparticles Designed for Oral Drug Delivery. *Int J Pharm* **2017**, *523*, 418–426, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.016.
10. Xavier, P.; Jain, S.; Srinivas T, V.; Chatterjee, K.; Bose, S. Designer Porous Antibacterial Membranes Derived from Thermally Induced Phase Separation of PS/PVME Blends Decorated with an Electrospun Nanofiber Scaffold. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 10865–10872, doi:10.1039/C5RA24084K.
11. Chhabra, H.; Deshpande, R.; Kanitkar, M.; Jaiswal, A.; Kale, V.P.; Bellare, J.R. A Nano Zinc Oxide Doped Electrospun Scaffold Improves Wound Healing in a Rodent Model. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 1428–1439, doi:10.1039/C5RA21821G.
12. Sista, D. New Perspective of Nano Fibers: Synthesis and Applications. In *Nanofibers - Synthesis, Properties and Applications*; IntechOpen, 2021.
13. Luraghi, A.; Peri, F.; Moroni, L. Electrospinning for Drug Delivery Applications: A Review. *Journal of Controlled Release* **2021**, *334*, 463–484, doi:10.1016/j.jconrel.2021.03.033.

14. Wang, C.; Wang, J.; Zeng, L.; Qiao, Z.; Liu, X.; Liu, H.; Zhang, J.; Ding, J. Fabrication of Electrospun Polymer Nanofibers with Diverse Morphologies. *Molecules* **2019**, *24*, 834, doi:10.3390/molecules24050834.
15. Sharma, P.; Brown, S.; Walter, G.; Santra, S.; Moudgil, B. Nanoparticles for Bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci* **2006**, *123–126*, 471–485, doi:10.1016/j.cis.2006.05.026.
16. Mahendra Kumar, S.; Rajni, Y.; Sandeep Prasad, T. Recent Advances in Nanotechnology. *International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine* **2023**, *9*, 015–023, doi:10.17352/2455-3492.000053.
17. 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* **2005**, *109*, 169–188, doi:10.1016/J.JCONREL.2005.09.034.
18. Grover, K.; Koblova, A.; Pezacki, A.T.; Chang, C.J.; New, E.J. Small-Molecule Fluorescent Probes for Binding- and Activity-Based Sensing of Redox-Active Biological Metals. *Chem Rev* **2024**, *124*, 5846–5929, doi:10.1021/acs.chemrev.3c00819.
19. Lovell, T.C.; Branchaud, B.P.; Jasti, R. An Organic Chemist's Guide to Fluorophores – Understanding Common and Newer Non-Planar Fluorescent Molecules for Biological Applications. *European J Org Chem* **2024**, *27*, doi:10.1002/ejoc.202301196.
20. Alvarez, A.; Costa-Fernández, J.M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A.; Salinas-Castillo, A. Fluorescent Conjugated Polymers for Chemical and Biochemical Sensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 1513–1525, doi:10.1016/j.trac.2011.04.017.
21. Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **1995**, *51*, L7–L21, doi:10.1016/0584-8539(95)01421-P.
22. Aina, V.; Malavasi, G.; Magistris, C.; Cerrato, G.; Martra, G.; Viscardi, G.; Menabue, L.; Lusvardi, G. Conjugation of Amino-Bioactive Glasses with 5-Aminofluorescein as Probe Molecule for the Development of PH Sensitive Stimuli-Responsive Biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* **2014**, *25*, 2243–2253, doi:10.1007/s10856-014-5206-4.
23. Zhang, X.F. The Effect of Phenyl Substitution on the Fluorescence Characteristics of Fluorescein Derivatives via Intramolecular Photoinduced Electron Transfer. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2010**, *9*, 1261–1268, doi:10.1039/c0pp00184h.
24. Zhang, X.F.; Zhang, J.; Liu, L. Fluorescence Properties of Twenty Fluorescein Derivatives: Lifetime, Quantum Yield, Absorption and Emission Spectra. *J Fluoresc* **2014**, *24*, 819–826, doi:10.1007/s10895-014-1356-5.
25. Mchedlov-Petrosyan, N.O.; Cheipesh, T.A.; Roshal, A.D.; Doroshenko, A.O.; Vodolazkaya, N.A. Fluorescence of Aminofluoresceins as an Indicative Process

Allowing One to Distinguish between Micelles of Cationic Surfactants and Micelle-like Aggregates. *Methods Appl Fluoresc* **2016**, *4*, 034002, doi:10.1088/2050-6120/4/3/034002.

26. McHedlov-Petrosyan, N.O.; Cheipesh, T.A.; Roshal, A.D.; Shekhovtsov, S. V.; Moskaeva, E.G.; Omelchenko, I. V. Aminofluoresceins Versus Fluorescein: Peculiarity of Fluorescence. *Journal of Physical Chemistry A* **2019**, *123*, 8860–8870, doi:10.1021/acs.jpca.9b05812.
27. Siu, H.; Duhamel, J. Global Analysis of the Fluorescence Decays of a Pyrene-Labeled Polymer Using a Blob Model. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9287–9289, doi:10.1021/ma049032n.
28. Siu, H.; Duhamel, J. Molar Absorption Coefficient of Pyrene Aggregates in Water. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 15301–15312, doi:10.1021/jp801105q.
29. Tsushima, M.; Ohta, N. Electric Field Effects on Photoinduced Electron Transfer Processes of Methylene-Linked Compounds of Pyrene and N,N-Dimethylaniline in a Polymer Film. *J Chem Phys* **2004**, *120*, 6238–6245, doi:10.1063/1.1651086.
30. Adhikari, B.; Nanda, J.; Banerjee, A. Pyrene-Containing Peptide-Based Fluorescent Organogels: Inclusion of Graphene into the Organogel. *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 11488–11496, doi:10.1002/chem.201101360.
31. Duhamel, J. New Insights in the Study of Pyrene Excimer Fluorescence to Characterize Macromolecules and Their Supramolecular Assemblies in Solution. *Langmuir* **2012**, *28*, 6527–6538, doi:10.1021/la2047646.
32. InvivoChem 1-Pyrenemethylamine Hydrochloride.
33. Bao, Y. Controlling Molecular Aggregation-Induced Emission by Controlled Polymerization. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26206267.
34. Thomas, S.W.; Joly, G.D.; Swager, T.M. Chemical Sensors Based on Amplifying Fluorescent Conjugated Polymers. *Chem Rev* **2007**, *107*, 1339–1386, doi:10.1021/cr0501339.
35. Kim, H.N.; Guo, Z.; Zhu, W.; Yoon, J.; Tian, H. Recent Progress on Polymer-Based Fluorescent and Colorimetric Chemosensors. *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 79–93, doi:10.1039/c0cs00058b.
36. Yuan, J.; Wang, S.; Shan, J.; Peng, J.; Wei, L.; Xu, X. Formation and Photoluminescence of Fluorescent Polymers. *Int J Polym Sci* **2010**, *2010*, 1–2, doi:10.1155/2010/526348.
37. Fantini, D.; Costa, L. Dye, Fluorophores and Pigment Coloration of Nanofibers Produced by Electrospinning. *Polym Adv Technol* **2009**, *20*, 111–121, doi:10.1002/pat.1283.
38. Mira, A.; Mateo, C.R.; Mallavia, R.; Falco, A. Poly(Methyl Vinyl Ether-Alt-Maleic Acid) and Ethyl Monoester as Building Polymers for Drug-Loadable Electrospun Nanofibers. *Sci Rep* **2017**, *7*, doi:10.1038/s41598-017-17542-4.

39. Yang, Y.; Fan, X.; Long, Y.; Su, K.; Zou, D.; Li, N.; Zhou, J.; Li, K.; Liu, F. A Simple Fabrication of Electrospun Nanofiber Sensing Materials Based on Fluorophore-Doped Polymer. *J Mater Chem* **2009**, *19*, 7290–7295, doi:10.1039/b908154b.
40. Rubio-Camacho, M.; Martínez-Tomé, M.J.; Mira, A.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Formation of Multicolor Nanogels Based on Cationic Polyfluorenes and Poly(Methyl Vinyl Ether-Alt-Maleic Monoethyl Ester): Potential Use as PH-Responsive Fluorescent Drug Carriers. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 9607, doi:10.3390/ijms22179607.
41. Bagchi, B.; Oxtoby, D.W.; Fleming, G.R. Theory of the Time Development of the Stokes Shift in Polar Media. *Chem Phys* **1984**, *86*, 257–267, doi:10.1016/0301-0104(84)80014-2.

