



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**Departamento de Medio Ambiente y Agricultura,  
Área de Física-Química**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**  
**Curso 2022-2023**

**Trabajo Fin de Grado**

**María Antón Gil**

---

# **Desarrollo de Nanoestructuras Poliméricas con L-triptófano y 5-aminolevulínico para diferentes tratamientos**

---

**Tutor:** Amalia Mira Carrió

**Co – tutores:** Ricardo Mallavia Marín y Marta Fernández

## RESUMEN

En los avances actuales acerca de la investigación sobre nanoestructuras de fármacos u otros compuestos de interés los polímeros son materiales con alto interés debido a su variedad y versatilidad. En el siguiente trabajo se han sintetizado nanopartículas preparadas usando como matriz polimérica principal el poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-ES). Las nanopartículas obtenidas han sido caracterizadas por dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de barrido (FSEM). Como compuestos activos seleccionados se encapsuló el fármaco 5-aminolevulínico (5-ALA) y el aminoácido L-Triptófano. En ambos casos, los diámetros obtenidos fueron de 200-600 nm obteniéndose una eficacia de encapsulación cercana al 100% en el caso del 5-ALA y muy baja en el caso del aminoácido por HPLC y espectroscopía de absorción respectivamente.

**Palabras clave:** Aminoácidos – Triptófano - 5-ALA – Nanopartículas-Nanofibras

## ABSTRACT

In the current advances in research on nanostructures of drugs or other compounds of interest, polymers are materials of great interest due to their variety and versatility. In the following work we have synthesized nanoparticles prepared using poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) (PMVEMA-ES) as the main polymeric matrix. The obtained nanoparticles have been characterized by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (FSEM). The drug 5-aminolevulin (5-ALA) and the amino acid L-tryptophan were encapsulated as selected active compounds. In both cases, the diameters obtained were 200-600 nm obtaining an encapsulation efficiency close to 100% in the case of 5-ALA and very low in the case of the amino acid by HPLC and absorption spectroscopy respectively. In the following work we have synthesized nanoparticles prepared using poly(methyl vinyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) (PMVEMA-ES) as the main polymeric matrix. The obtained nanoparticles have been characterized by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (FSEM). The drug 5-aminolevulin (5-ALA) and the amino acid L-tryptophan were encapsulated as selected active compounds. In both cases, the diameters obtained were 200-600 nm, obtaining an encapsulation efficiency close to 100% in the case of 5-ALA and very low in the case of the amino acid by HPLC and absorption spectroscopy, respectively.

**Keywords:** Amino Acids - Tryptophan - 5-ALA - Nanoparticles-Nanofibers

# ÍNDICE

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                        | 4  |
| 1.1. Nanopartículas .....                                                    | 5  |
| 1.2. Nanofibras .....                                                        | 7  |
| 1.3. Electrospinning .....                                                   | 8  |
| 1.4. Polímero .....                                                          | 14 |
| 1.5. Agente Neoplásico.....                                                  | 16 |
| 1.6. Triptófano.....                                                         | 17 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                           | 18 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                 | 19 |
| 3.1. Reactivos y Disolventes .....                                           | 19 |
| 3.2. Síntesis de Nanopartículas .....                                        | 19 |
| 3.2.1. Reactivos y Disolventes .....                                         | 21 |
| 3.3. Síntesis de Nanofibras .....                                            | 22 |
| 3.3.1. Preparación de las disoluciones .....                                 | 22 |
| 3.4. Espectroscopia de correlación de fotones .....                          | 23 |
| 3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....                   | 23 |
| 3.6. Microscopía Electrónica de Transmisión.....                             | 26 |
| 3.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....                           | 26 |
| 3.8. Espectrometría de Absorción .....                                       | 27 |
| 4. RESULTADOS.....                                                           | 29 |
| 4.1 Caracterización de las nanopartículas y las nanofibras poliméricas ..... | 29 |
| 4.1.1 Tamaño y morfología de las nanopartículas .....                        | 29 |
| 4.1.2 Tamaño y morfología de las nanofibras .....                            | 32 |
| 4.2. Eficiencia de encapsulación de las nanopartículas.....                  | 35 |
| 4.2.1. Nanopartículas de PMEVA-Es con 5-ALA.....                             | 35 |
| 4.2.2. Nanopartículas de PMEVA-Es con L-triptófano.....                      | 36 |
| 5. DISCUSIÓN .....                                                           | 36 |
| 6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA.....                                       | 39 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA .....                                                        | 40 |

# 1. INTRODUCCIÓN

La Nanobiotecnología es una disciplina frontera entre la Biotecnología y la Nanotecnología. Esta conexión entre ambas ciencias ofrece la utilización de nuevos nanomateriales con nuevas características e incluso mejores que los que ya existen hoy en día [1]. Combinando estos materiales con moléculas biológicas o sintéticas se pueden llegar a fabricar nanoestructuras con propiedades únicas [2].

La nanotecnología en los últimos 30 años se está llevando a cabo en gran parte de laboratorios, destacando la rama de las ciencias de la salud gracias a diferentes tecnologías como son la de polímeros y la biotecnología. Con ello están en auge las propuestas de nuevas terapias contra enfermedades relevantes como pueden ser el cáncer.

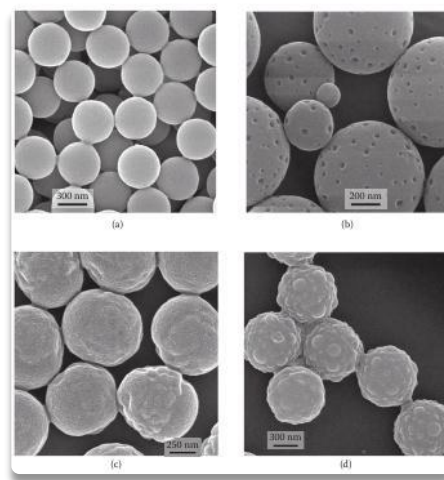
En la actualidad la nanotecnología ha sufrido un gran movimiento ya que ofrece soluciones para el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas en biomedicina como son las alternativas a los tratamientos convencionales.

En cuanto a los materiales que se pueden utilizar para desarrollar estas nanoestructuras se encuentran los polímeros que presentan ventaja sobre otros materiales de comprender un gran número de moléculas biodegradables y biocompatibles. Algunos de estos polímeros son modificados mediante protocolos cortos y viables para la fabricación de diferentes tipos de nanoestructuras susceptibles de ser cargadas y así poder cubrir las necesidades clínicas requeridas. Estos sistemas se pueden ajustar al tamaño para adaptarse a los requisitos de la ruta o al dispositivo por el cual va a ser suministrado. Atendiendo a esta última característica, las formas más populares, pero variables, son principalmente nanopartículas, aunque las nanofibras poliméricas están adquiriendo cada vez más importancia debido a sus características únicas, adecuadas para aplicaciones médicas tales como prótesis de tejidos y apósitos [3-6].

## 1.1. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs), unas de las nanoestructuras a estudiar en este trabajo, son definidas como partículas coloidales con tamaños que varían entre los 10-1000 nm. Estas nanoestructuras han demostrado tener un gran potencial para transportar fármacos usados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades [7-8] (Figura 1).

Las nanopartículas con un tamaño inferior a 10 nm se excretan por la orina sin llegar a la diana terapéutica y, si su tamaño es superior a 1000 nm se las considera micropartícula [9].



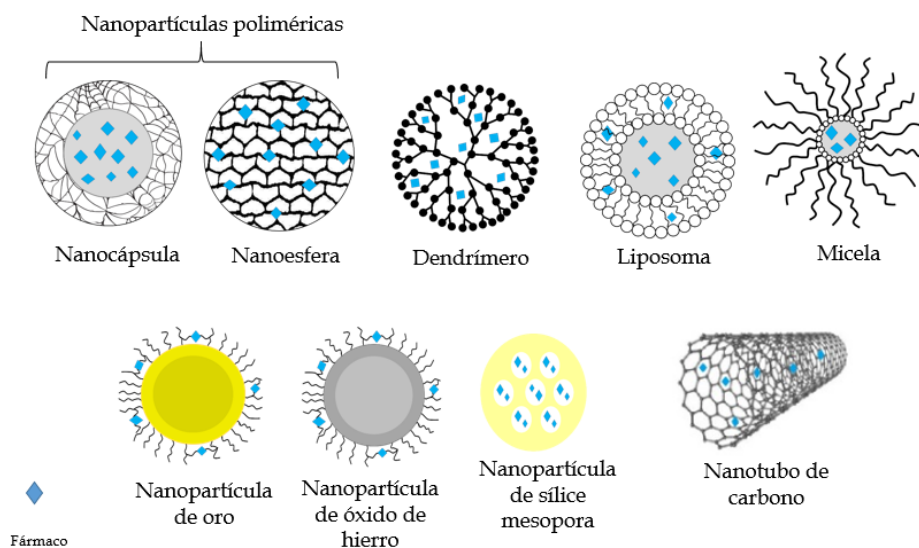
**Figura 1. Imágenes en microscopía de nanopartículas.** Imágenes a diferentes escalas de nanopartículas poliméricas.

Las principales ventajas que nos ofrecen las NPs como nanotransportadores son:

- Presentar una relación de superficie en proporción a su volumen muy grande, por tanto, las hacen tener una mayor capacidad de encapsulación de compuestos activos, así como de interacción con su entorno [10].
- Atravesar barreras biológicas como mucosas gastrointestinales o respiratorias, la barrera hematoencefálica, la piel, e incluso alcanzar compartimentos intracelulares debido a su reducido tamaño [10].

- Proteger y mejorar la estabilidad física y química de los principios activos encapsulados desde su fabricación, almacenamiento, distribución y administración hasta alcanzar su lugar de acción [10].
- Controlar la liberación del fármaco en su lugar de acción o absorción, y con ello, minimizar los efectos secundarios [11].
- Aumentar la biodisponibilidad de los fármacos haciendo llegar mayor cantidad de los mismos a la diana terapéutica [12].

Las nanopartículas se pueden clasificar según su naturaleza química en: inorgánica (plata, oro, sílice, fosfato cálcico, magnéticas, quantum dots (óxidos metálicos), orgánicas (poliméricas, liposomas, dendrímeros y micelas) e híbridas (combinan ambos tipos). A su vez, las nanopartículas poliméricas o también denominadas convencionales se agrupan en nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son sistemas matriciales, es decir, el fármaco o sustancia activa se encuentra disperso o absorbido en una matriz polimérica. Por su parte, las nanocápsulas son sistema reservorio, es decir, el fármaco se encuentra en el interior de una cavidad central recubierta por una membrana polimérica (Figura 2).



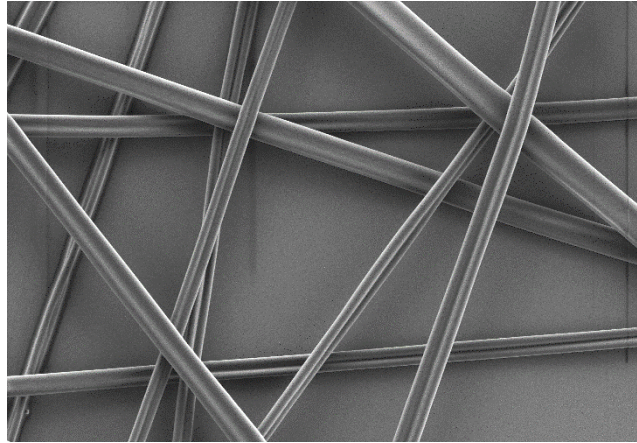
**Figura 2. Clasificación de NPs.** Tipos de NPs utilizadas como transportadores de fármacos.

## 1.2. Nanofibras

Las nanofibras son materiales unidimensionales y se caracterizan por presentar un diámetro ( $\Phi$ ) generalmente entre 50 y 500 nm y una longitud (L) con una relación  $L/\Phi > 10$ . Su tamaño les confiere una elevada relación superficie/volumen, poseen una alta porosidad y un pequeño tamaño de poro (Figura 3). Además, los sistemas nanoestructurados manifiestan unas propiedades de superficie diferentes a los materiales convencionales. Para su uso en biomedicina un requisito inicial es que las nanofibras estén compuestas de materiales biocompatibles que hayan demostrado no presentar toxicidad sobre los tejidos y organismos vivos. Con este fin se emplean mayoritariamente polímeros sintéticos (poliésteres, polialcoholes, poliéteres y polianhídridos) o biopolímeros (quitina, quitosano, colágeno, fibroína de seda o celulosa).

Actualmente existen varias aplicaciones terapéuticas en desarrollo entre las cuales destacan la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. En ellas se utilizan las nanofibras para fabricar estructuras tridimensionales porosas y ordenadas simulando de esta manera la matriz extracelular y estimulando el crecimiento celular. Estas aplicaciones han sido utilizadas con éxito tanto para la fabricación de tejidos in vitro como para la regeneración in vivo de heridas y lesiones músculo-esqueléticas [13-14]. Las nanofibras también son de interés en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas para la vía tópica, habitualmente en forma de apósitos, parches transdérmicos o implantes biodegradables [15].

Especialmente, se han realizado estudios sobre la vehiculización y liberación de factores de crecimiento, genes, células madre para medicina regenerativa [16-17], antibióticos para profilaxis de infecciones asociadas a prótesis [16-17] y antitumorales cuando se prefiere un efecto local para aumentar la eficacia y minimizar toxicidad sistémica.



**Figura 3. Imágenes en microscopía de nanofibras.** Imagen a escala 5  $\mu\text{m}$ .

### **1.3. Electrospinning**

El electrospinning (electrohilatura) es una técnica patentada en 1934 por Formhals y que sigue en constante desarrollo. Es una metodología que comenzó a ser utilizada en el año 1990 por su gran variabilidad en el electrohilado de fibras poliméricas y la producción de nanofibras de bajo coste. Este método se diferencia por su gran sencillez, versatilidad, bajo coste, efectividad, facilidad de implantación y por la posibilidad de utilizarlas para un escalado industrial [18].

Optimizando los parámetros de electrospinning, se logra un control de las características morfológicas de las fibras electrohiladas. En estos parámetros se incluye la disolución polimérica empleada y las condiciones experimentales como se verá a lo largo de este trabajo [19].

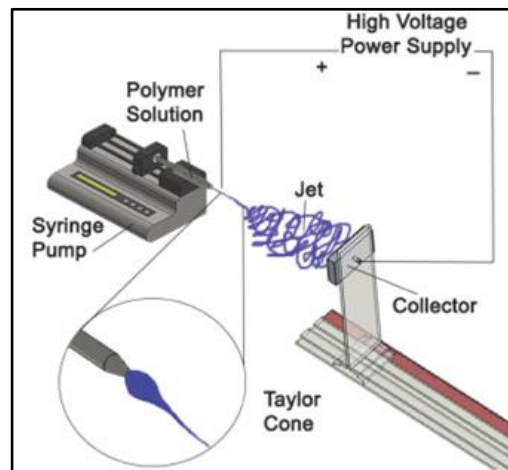
Los principios de esta técnica se basan en aplicar un elevado campo electrostático entre dos polos mediante un generador de corriente. El equipo está formado por distintas partes: sistema de inyección que impulsa la disolución gracias al uso de una bomba peristáltica. La disolución es previamente depositada en el interior de una jeringa. La bomba hace salir la disolución por una aguja en dirección al colector metálico donde se depositan las fibras, formando una película de baja relación peso-volumen[20].

El equipo puede instalarse de forma vertical u horizontal, siendo seleccionada la disposición horizontal para la realización de este proyecto. La ventaja de esta posición

es que, si hay disolvente que no se evapora, éste caerá hacia abajo y por tanto, no diluirá las fibras si cae sobre ellas. Sin embargo, esta disposición presenta el inconveniente de que podemos tener pérdidas en el caso de que no toda la disolución forme fibras [18].

Según muestra la figura 4, a la izquierda se encuentra la jeringa cargada con la disolución polimérica, en la cual se encuentra el principio activo. Donde está la jeringa cargada se sitúa una bomba de infusión para empujar el fluido con el objetivo de conseguir el flujo deseado. La bomba empuja el émbolo de la jeringa, generando una presión firme que se traspasa a la disolución del polímero en la aguja. El campo eléctrico, genera una polarización y carga que provoca que la disolución sea atraída hacia la superficie conductora en forma de chorro denominado jet. La aguja se establece a una distancia determinada del colector y está conectada a su vez a un potencial cero.

El disolvente donde se encuentra el compuesto activo se va evaporando poco a poco a medida que recorre el camino entre la aguja y el colector, de esta forma se consiguen fibras distribuidas al azar que acaban depositándose en el colector [20].



**Figura 4:** Equipo de electrospinning en configuración horizontal

Entre la distancia de los electrodos situados en la punta de la aguja y el colector, se inducen cargas en el fluido, se rompe la tensión superficial por el campo eléctrico y se descompone en la fuerza tangencial ( $t$ ) y una normal, y se provoca el llamado fenómeno cono de Taylor. Este proceso origina una aceleración significativa en el jet y en consecuencia su diámetro disminuye en magnitud. Este jet termina formándose

sólido, convirtiéndose en una fibra nanométrica. La corriente utilizada en este dispositivo es de un voltaje alto, pero con una intensidad muy reducida.

En cuanto a los resultados obtenidos muchas veces no son los que se quieren debido a que depende del control de muchas variables, tanto del disolvente y el polímero como las del equipo de electrospinning y las medioambientales.

En muchos casos no se consiguen nanofibras poliméricas homogéneas, sino que se obtienen nanofibras con ciertos defectos como pueden ser la formación de gotas o fibras mezcladas con gotas (Figura 5).



**Figura 5:** Defectos en nanofibras con triptófano (10x).

Es muy importante el control del equipo de electrospinning y hay que tener en cuenta varios parámetros que afectan a la vez a la morfología de las fibras. Estos parámetros operacionales los podemos clasificar en tres grupos [20].

1. Variables del equipo:

- Velocidad del flujo
- Potencial eléctrico
- Distancia entre la aguja y el colector
- Tipo de colector

2. Propiedades de la disolución:

- Tipo de polímero empleado
- Viscosidad
- Conductividad

- Concentración del polímero
- Densidad de carga en la superficie
- Constante dieléctrica del disolvente
- Tensión superficial

### 3. Parámetros ambientales:

- Humedad relativa
- Temperatura de la disolución
- Velocidad del aire en la cámara

Con la tabla siguiente se pueden observar los efectos en la morfología de la fibra de forma individual, aunque durante el proceso de la técnica pueden existir interrelaciones entre estos parámetros que puede complicar el proceso de electrohilado [18].

**TABLA 1:** PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA MORFOLOGÍA DE LAS NANOFIBRAS.

|               | Parámetros                          | Efectos en la morfología de la fibra                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Equipo</b> | <b>Distancia<br/>Aguja-colector</b> | Existe una distancia óptima para la obtención de fibras, que implica que a distancias más elevadas o más pequeñas se formen aglomeraciones.                                                                                                                     |
|               | <b>Velocidad de<br/>flujo</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- A elevada velocidad de flujo no permite la evaporación completa del disolvente.</li> <li>- A velocidades de flujo pequeñas permite un menor grosor de fibras.</li> </ul> <p>Velocidades de flujo entre 0.5-2 ml/h.</p> |
|               | <b>Voltaje</b>                      | Un voltaje elevado implica mayor campo eléctrico que provoca estrechamiento de la fibra y favorece la evaporación del disolvente.                                                                                                                               |
|               |                                     | Es necesario un peso molecular alto para poder obtener fibras.                                                                                                                                                                                                  |

|                            |                            |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Solución polimérica</b> | <b>Peso molecular</b>      |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                            | <b>Concentración</b>       | <p>La concentración está relacionada con la viscosidad.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A concentraciones muy altas se obtiene fibras de mayor grosor.</li> <li>- A concentraciones muy bajas no se obtienen fibras o aparecen de forma discontinua.</li> </ul> |
|                            | <b>Conductividad</b>       | Una alta conductividad favorece la uniformidad de las fibras, un menor tamaño y menos defectos.                                                                                                                                                                              |
|                            | <b>Tensión superficial</b> | Si la tensión superficial es alta crea inestabilidad en el haz con aparición de defectos.                                                                                                                                                                                    |
| <b>Ambiente</b>            | <b>Temperatura</b>         | <p>La temperatura afecta directamente a la viscosidad de la disolución polimérica.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A una mayor temperatura disminuye la viscosidad y por lo tanto el diámetro de las fibras.</li> </ul>                                         |
|                            | <b>Humedad relativa</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Valores de humedad altos conducen a la formación de poros en las fibras.</li> <li>- A valores bajos, el disolvente puede evaporarse más rápido y obstruir la aguja.</li> </ul>                                                      |

El tamaño y la morfología de las fibras se puede ver influenciado por la concentración de la disolución. La concentración de polímero en la disolución influye tanto en la tensión superficial de la disolución como en la viscosidad. La distribución de las cadenas poliméricas está directamente relacionada con la viscosidad de la disolución, ya que si la disolución presenta una viscosidad alta estas cadenas se encuentran más enredadas y viceversa. Además, cuanto más alta sea la viscosidad de la disolución más diámetro presentarán las fibras. En cambio, se formarán fibras con presencia de gotas cuando la disolución este muy diluida debido al efecto de la tensión superficial y no se formarán gotas cuando la disolución este muy concentrada debido a la alta viscosidad que produce resistencia al paso de la disolución a través del capilar.

El voltaje es uno de los factores más importantes dentro de los parámetros del equipo del electro spinning. En estudios realizados, algunos autores afirman que utilizando voltajes altos se obtienen fibras con diámetros más grandes y otros que afirman que el diámetro disminuye siento más alta la probabilidad de obtener fibras defectuosas. En la mayoría de los estudios, utilizar un voltaje alto genera fibras con diámetros más pequeños. Además, la influencia del voltaje depende también de las propiedades viscoelásticas del material que se utilice, por ello, el tipo de polímero que se emplee en cada caso influirá en el voltaje y por ello también en el diámetro de las fibras.

Otro de los parámetros del electro spinning es el flujo de salida, el cual está relacionado con el diámetro de la aguja, la cantidad de disolución disponible para el proceso de electro spinning está condicionado por este parámetro. El empleo de un flujo pequeño tiene como beneficios evitar la aparición de defectos en las nanofibras, ya que el disolvente tiene más tiempo para evaporarse. En cambio, el empleo de un flujo demasiado alto provocaría un aumento en el tamaño de las fibras, en el número de estas y en la probabilidad de formar nanofibras defectuosas. El flujo de salida debe tener un volumen adecuado para permitir obtener la formación de un cono de Taylor estable

La distancia aguja-colector es otro parámetro que debemos tener en cuenta al utilizar el electro spinning. La distancia entre la aguja y el colector influirá en las fibras, donde también influye las propiedades de la disolución. Emplear distancias aguja-colector muy grandes puede provocar que las nanofibras se rompan, especialmente si estas fibras son de pequeño tamaño. Es necesario una mínima distancia entre la aguja y el colector para que el disolvente de las fibras se evapore antes de llegar al objeto colector. En estudios anteriores se comprueba que al utilizar mayores distancias aguja-colector se realiza un tiempo de vuelo mayor, lo que se traduce en un mayor estiramiento de las fibras antes de llegar al plato colector y depositarse. Se ha observado la aparición de gotas o fibras húmedas en distancias muy grandes o excesivamente pequeñas.

En los parámetros ambientales se observó que trabajar con una humedad muy alta provocaba la aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras. El empleo de esta humedad provoca que el agua condensada en la superficie de las

fibras pueda influir en la morfología de las fibras, más aún cuando se trabaja con disolventes volátiles.

Para caracterizar de la mejor forma posible las fibras debemos tener en cuenta tres propiedades importantes.

- **Sin malformaciones:** La superficie de las fibras no debe presentar malformaciones.
- **No aglomeraciones:** Intentar sintetizar fibras aisladas, no pegadas, para que su estudio sea más sencillo.
- **Distribución monomodal:** Las fibras deben presentar diámetros controlados y representativos.

## 1.4. Polímero

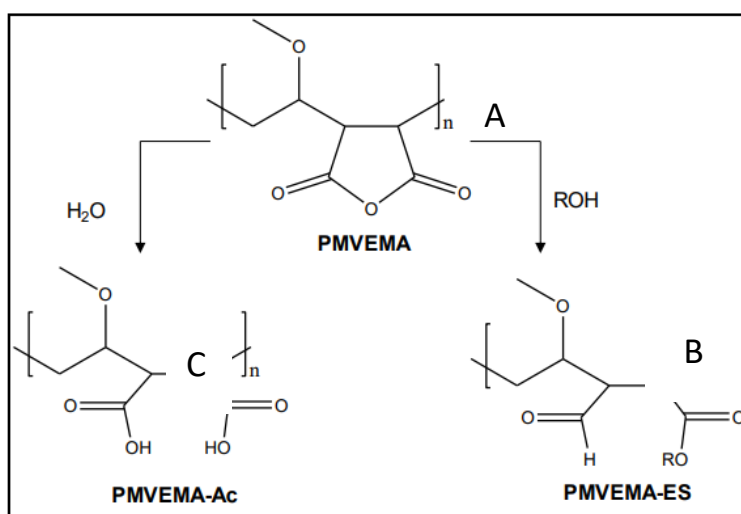
En la ciencia siempre se están buscando nuevas estrategias alternativas a las que ya existen para mejorar o aumentar la efectividad de diferentes fármacos. En el ámbito de la nanotecnología los nuevos avances proporcionan herramientas como la nanoencapsulación, es decir, la encapsulación de fármacos dentro de nanomateriales. Este avance, proporciona protección a los productos farmacéuticos y mejora su eficiencia, dando lugar a una mayor vida media biológica, facilitando también la administración dirigida y permitiendo una cinética de liberación controlada. La búsqueda y desarrollo de polímeros biocompatibles ayudaría a una tener una mayor versatilidad de nanoestructuras, las cuales podrían adaptarse a aplicaciones específicas como las nanopartículas o las nanofibras [21-23]

Para este Trabajo de Fin de Grado se ha utilizado un polímero biocompatible para la síntesis de nanofibras poliméricas y nanopartículas. Actualmente nuestro laboratorio es el único que investiga con este polímero [21-23].

El polímero utilizado se denomina poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-ES). Este polímero es un derivado del PMVEMA-An (poli (metil vinil éter-alt-anhídrido maleico)).

La reactividad del PMVEMA-An (poli (metil vinil éter-alt-anhídrido maleico)) provoca que este polímero reaccione con una gran variedad de grupos nucleófilos, pudiendo formarse derivados como el PMVEMA-Ac (poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico)) al reaccionar con agua, o el PMVEMA-ES al reaccionar con un alcohol (Figura 6) [21].

El PMVEMA presenta propiedades biocompatibles, biodegradables y bioadhesivas. Por otro lado, es un material poco tóxico por ello se utiliza y se comercializa para otras aplicaciones biomédicas lo que ha dado lugar a que la FDA lo apruebe para ser utilizado como excipiente en formulaciones para administración tópica [21-23].



**FIGURA 6: ESQUEMA DEL PMVEMA-AN Y SUS DERIVADOS.**

**A. PMVEMA-AN. B. PMVEMA-ES. C. PMVEMA-Ac**

El PMVEMA-ES soluble en etanol y muy poco soluble en agua, por ello la homogeneidad con la que los fármacos se introduzcan en las nanofibras y como se queden distribuidos en su estructura se verá influenciado por la solubilidad del fármaco utilizado en los disolventes presentes en la disolución polimérica. Otro parámetro que influye en la morfología y en el diámetro de las nanofibras es la viscosidad, la cual se puede modificar ya que dependerá de la concentración a la que se haya preparado la disolución. Como se ha comentado anteriormente, si la viscosidad es muy alta se obtienen nanofibras con un diámetro más grande. Por ello, los parámetros operacionales deben de ajustarse hasta que se obtengan las fibras deseadas en una escala nanométrica. Para cada polímero se deben optimizar las condiciones operacionales [19]

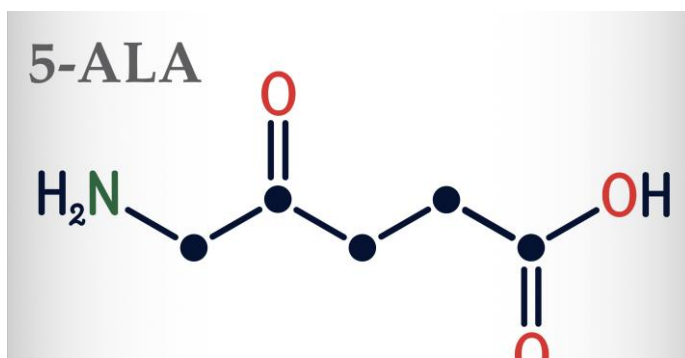
## 1.5. Agente Neoplásico

El compuesto terapéutico modelo usado para el desarrollo de este trabajo es el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) conocido también como 5-amino-4-oxo-pentanoico, el cuál procede de la síntesis de succinil coenzima A y glicerina mediada por la enzima ALA sintetasa. El 5-ALA es el compuesto que inicia la biosíntesis del grupo hemo, cofactor de la hemoglobina, en la vía de las porfirinas (Figura 7).

Como agente terapéutico, el ácido 5-aminolevulínico es un profármaco que *in vivo* se bioactiva a la protoporfirina IX (PpIX), una estructura tetrapirrólica que se forma debido a la condensación de moléculas de 5-ALA. La PpIX es un compuesto fluorescente y fotoactivo que se acumula en estructuras intracelulares, principalmente en las mitocondrias [24] (Figura 8).

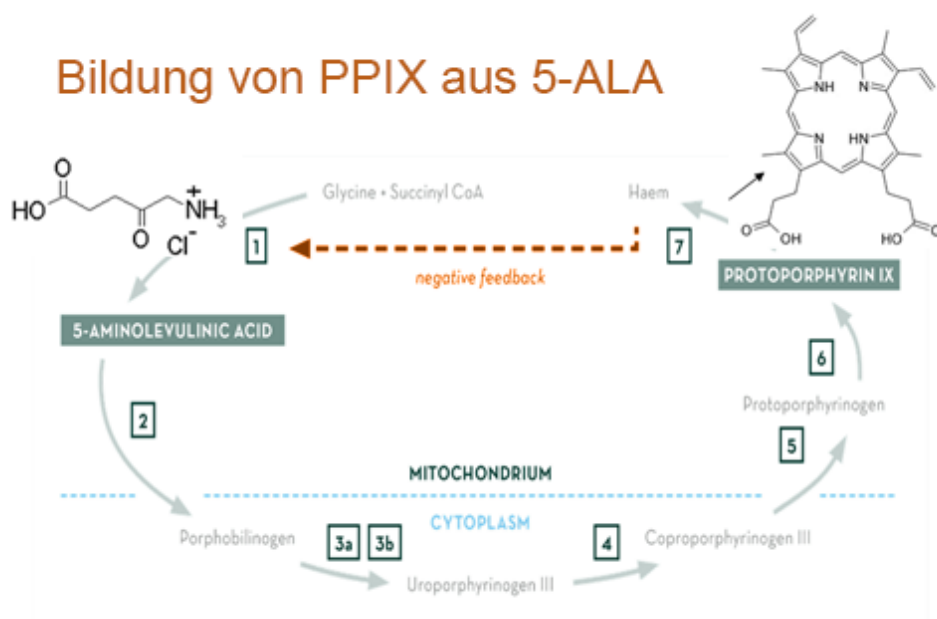
Mediante mecanismos oxidativos, la PpIX induce la formación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, los cuales producen daño celular y finalmente la muerte de las células afectadas por apoptosis [24]. Al formarse un compuesto fluorescente y fotoactivo su tratamiento se lleva a cabo mediante terapia fotodinámica (TFD).

La elección del 5-ALA se basa en que este compuesto se acumula y bioactiva con más fuerza a su diana terapéutica, las células hiperproliferativa.



**Figura 7:** ESTRUCTURA QUÍMICA DEL COMPUESTO 5-AMINOLEVULÍNICO

## Bildung von PPIX aus 5-ALA

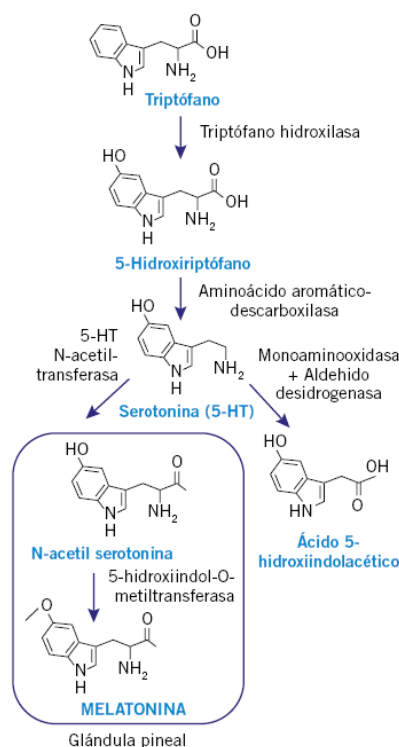


**FIGURA 8:** ESQUEMA DE LA FORMACIÓN DE LA PROTOPORFIRINA IX EN LA VÍA DE LAS PORFIRINAS.

## 1.6. Triptófano

Se ha seleccionado este aminoácido en este estudio ya que es uno de los aminoácidos más esenciales entre los veinte aminoácidos incluidos en el código genético del ser humano y se obtiene a través de los alimentos. Es considerado uno de los aminoácidos esenciales debido a su estructura química como un LNAA (Large Neutral Amino Acid).

El cuerpo utiliza este aminoácido para la regulación de diversos procesos humanos básicos como el favorecimiento de la síntesis de melatonina, la N-acetilserotonina y la serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina), que actúan como neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas llevando a cabo la transmisión del impulso nervioso, la regulación del ciclo de sueño y la vigilia, el apetito, el estado afectivo y el dolor. Existen estudios que evidencian que concentraciones altas de triptófano reducen el estrés y la respuesta inflamatoria por lo que es muy importante mantener los niveles de triptófano adecuados (Figura 9) [26-27].



**FIGURA 9:** ESQUEMA DE LA VÍA DE ACTUACIÓN DEL TRIPTÓFANO.

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron el de optimizar el proceso de purificación en la síntesis de nanopartículas poliméricas, descrito en anteriores trabajos en este laboratorio, basándonos en las nanopartículas de 5-ALA y la determinación de la encapsulación de L-triptófano. Para conseguir este objetivo global se siguen los siguientes puntos:

- Síntesis de nanopartículas de PMEVA-Es con 5-ALA mediante el método de desplazamiento de disolvente, desarrollado anteriormente en este laboratorio.
- Síntesis de nanopartículas de PMEVA-Es con L-triptófano mediante el mismo método que el punto anterior.
- Síntesis de nanofibras de PMVEMA-Es con L-triptófano.
- Caracterización de las nanoestructuras.
- Eficacia de encapsulación de nanopartículas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Reactivos y Disolventes

Los diferentes reactivos y disolventes utilizados fueron adquiridos en su mayoría de Sigma-Aldrich (Saint Louise, EE.UU.). En el caso de proceder de otra casa comercial, esta será indicada. Los principales disolventes empleados fueron: etanol (pureza  $\geq 99,8$  %), acetonitrilo Cromasolv grado HPLC, ácido fórmico de Fluka (Madrid, España) y agua Milli-Q. El fármaco ácido 5-aminolevulínico (5-ALA;  $M_w=167,59$  g/mol) se adquirió en forma de hidrocloreto y el aminoácido L-triptófano ( $M_w=204,238$  g/mol).

El copolímero empleado poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) PMVEMA-ES, con  $M_w=130000$  g/mol, es un copolímero alternado derivado del poli (metil vinil éter-alt-anhidrido maleico) procedente de Sigma-Aldrich.

### 3.2. Síntesis de Nanopartículas

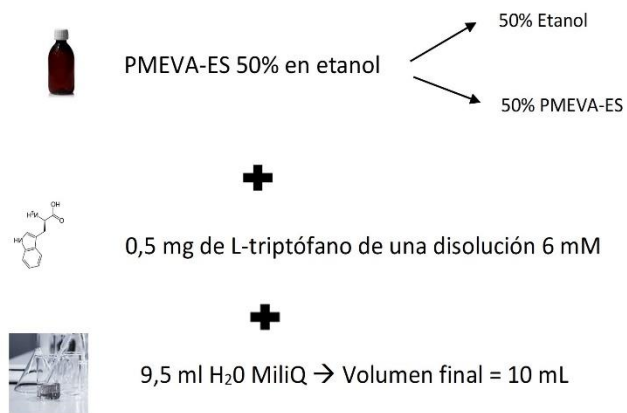
Para la formación de las nanopartículas de PMVEMA-ES, se realizó una modificación del método de desplazamiento de disolvente, descrito por primera vez por H. Salman y col. [28]. Este método se basa en una emulsificación espontánea entre una fase orgánica, donde se encuentra el polímero, y una fase acuosa.

El PMEVA-ES utilizado se encontraba al 50% en etanol. Se realizó una disolución al 2% en etanol con agitación magnética durante 10 min a 300 rpm (revoluciones por minuto), obteniéndose una disolución al 1% p/p etanol-PMEVA-ES real.

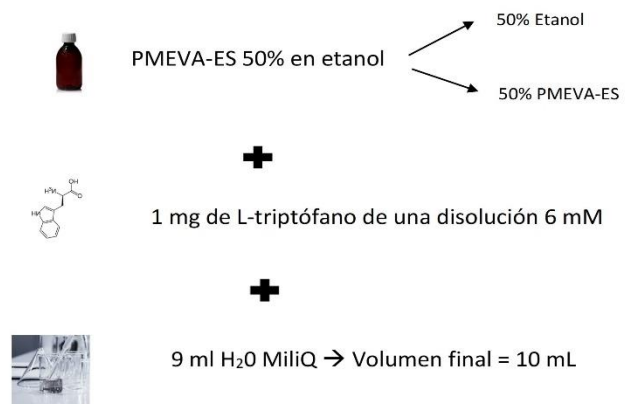
Seguidamente, para la síntesis de nanopartículas sin contenido encapsulado, se añadieron 10 mL de H<sub>2</sub>O MiliQ gota a gota a la solución realizada anteriormente, manteniendo la agitación. Para la síntesis de nanopartículas con contenido encapsulado, se preparó previamente una disolución 6mM de 5-ALA y otra disolución 6mM de L-triptófano.

Según la cantidad a encapsular se añadieron diferentes volúmenes de disoluciones 6 mM de 5-ALA y L-triptófano, según los siguientes esquemas:

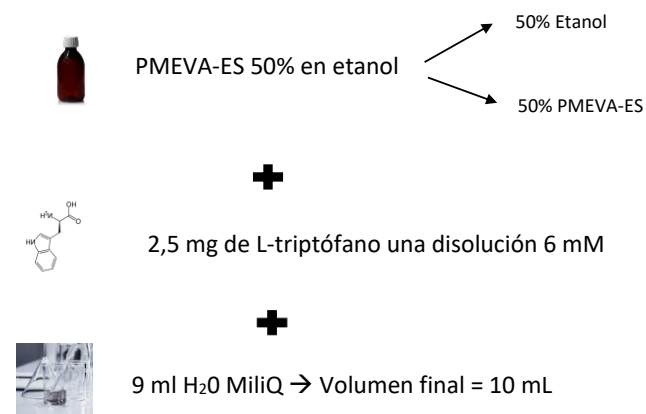
#### Nanopartículas PMEVA-ES 1% 5-ALA/PMEVA-ES (p/p)



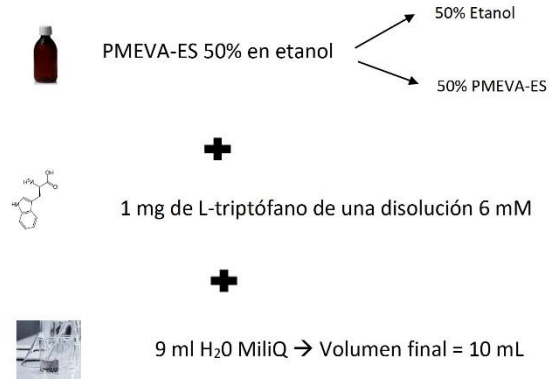
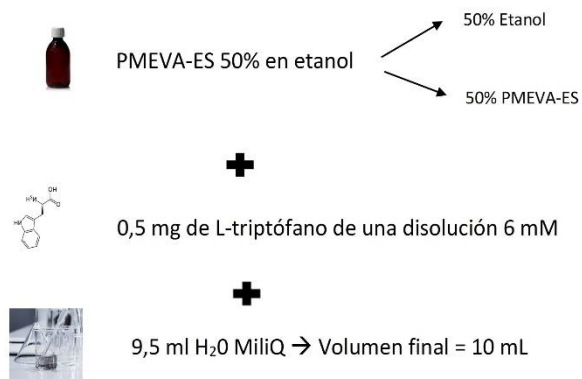
#### Nanopartículas PMEVA-ES 2% 5-ALA /PMEVA-ES (p/p)



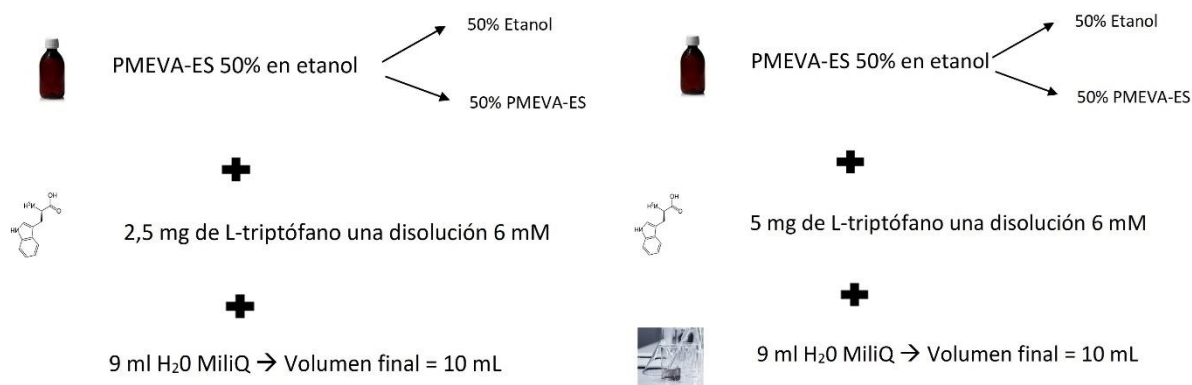
#### Nanopartículas PMEVA-ES 5% 5-ALA/PMEVA-ES (p/p)



#### Nanopartículas PMEVA-ES 1% L-Triptófano/PMEVA-ES (p/p) Nanopartículas PMEVA-ES 2% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)



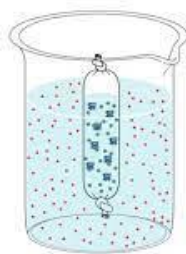
### Nanopartículas PMEVA-ES 5% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)    Nanopartículas PMEVA-ES 10% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)



### 3.2.1. Reactivos y Disolventes

Esta técnica se ha utilizado para la purificación de las nanopartículas sintetizadas con el fin de separar el material encapsulado de aquel que no haya sido. Para esta técnica se ha utilizado una membrana de diálisis cuyo cutoff es de 3500 Da (3500 g/mol) de Spectrumlabs.com, siendo un tamaño de poro suficiente para separar el polímero utilizado cuyo peso molecular es MW PMEVA-Es= 130000 g/mol) de nuestro material a encapsular de menor peso molecular. Los pesos moleculares de los compuestos que encapsulamos fueron: MW 5-ALA=167,59 g/mol y MW L-triptófano=204,238 g/mol (Figura 10).

Mediante este método las nanopartículas poliméricas con el material encapsulado se espera que se queden en el interior de la membrana y el resto de material no encapsulado o polímero fuera de las nanoestructuras se espera que salgan de la membrana.



**Figura 10:** Preparación diálisis.

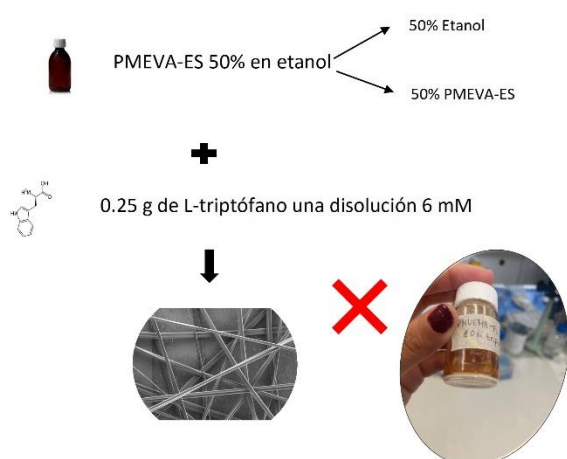
### 3.3. Síntesis de Nanofibras

#### 3.3.1. Preparación de las disoluciones

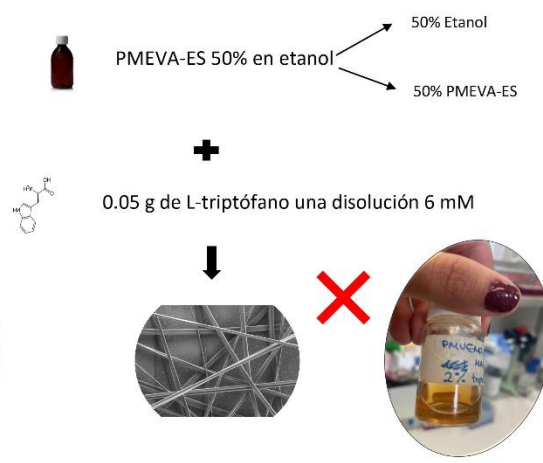
Como se ha podido comprobar en estudios anterior en nuestro laboratorio, el desarrollo de nanofibras se prepara realizando una disolución madre al 25% (p/p) en etanol, partiendo de una disolución comercial de PMEVA-Es al 50% en etanol con el fin de obtener nanofibras con la morfología deseada.

Tras realizar la disolución madre se preparan disoluciones a diferentes concentraciones de triptófano en agua. Observamos que las concentraciones de L-triptófano superiores al 0,5%, respecto al polímero, no se disolvía.

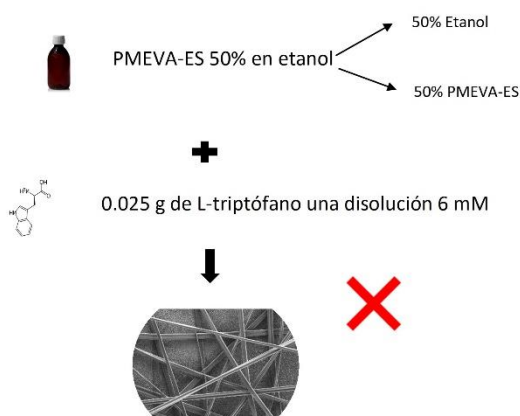
##### Nanofibras PMEVA-ES 10% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)



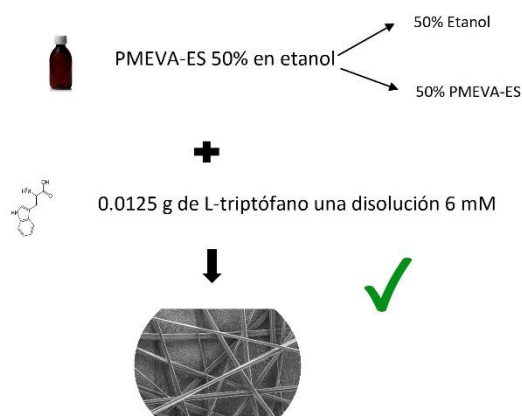
##### Nanofibras PMEVA-ES 2% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)



##### Nanofibras PMEVA-ES 1% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)



##### Nanofibras PMEVA-ES 0.5% L-Triptófano /PMEVA-ES (p/p)



### 3.4. Espectroscopia de correlación de fotones

El DLS llamado así por sus siglas en inglés: *Dynamic light Scattering*, es capaz de medir el movimiento browniano de las partículas en una dispersión y utiliza esta información para determinar su tamaño hidrodinámico, por ello lo utilizamos para conocer el tamaño de las nanopartículas sintetizadas y obtener información sobre su variabilidad. El tamaño hidrodinámico medido por el DLS se define como el tamaño de una esfera que se difunde a la misma velocidad que la partícula que se mide, la cual contiene la partícula central más cualquier ion, polímero u otra cosa que este unida a su superficie.

El equipo con el que se realizaron las medidas fue un Malvern Panalytical que utiliza una dispersión de luz dinámica clásica de 90° con un ángulo de medición de 90°. Para obtener las medidas de nuestras nanopartículas, se utilizaron cubetas de poliestireno cuadradas y desechables de 1 cm y 4,5 mL de volumen utilizando un volumen de 1,5 mL de muestra. El equipo se configuró para obtener 3 medidas por muestra y mostrar el valor medio de estas. Los resultados se expresan con la media de las tres medidas  $\pm$  desviación estándar (sd) .

### 3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para calcular la concentración de 5-ALA en el interior de las nanopartículas y la eficacia de encapsulación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El equipo utilizado fue un Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu Kioto, Japón) que se compone por un HPLC que incluye dos bombas unitarias, una unidad desgasificadora, un inyector automático, un horno termostatzado y un detector diodo array acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QqQ) con una interfase de ionización por electrospray (ESI). El procesado de datos se llevó a cabo mediante el software LabSolutions de Shimadzu. La columna empleada fue de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m)(Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

El método empleado fue una modificación del descrito anteriormente en nuestro laboratorio en la tesis doctoral “*Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados*

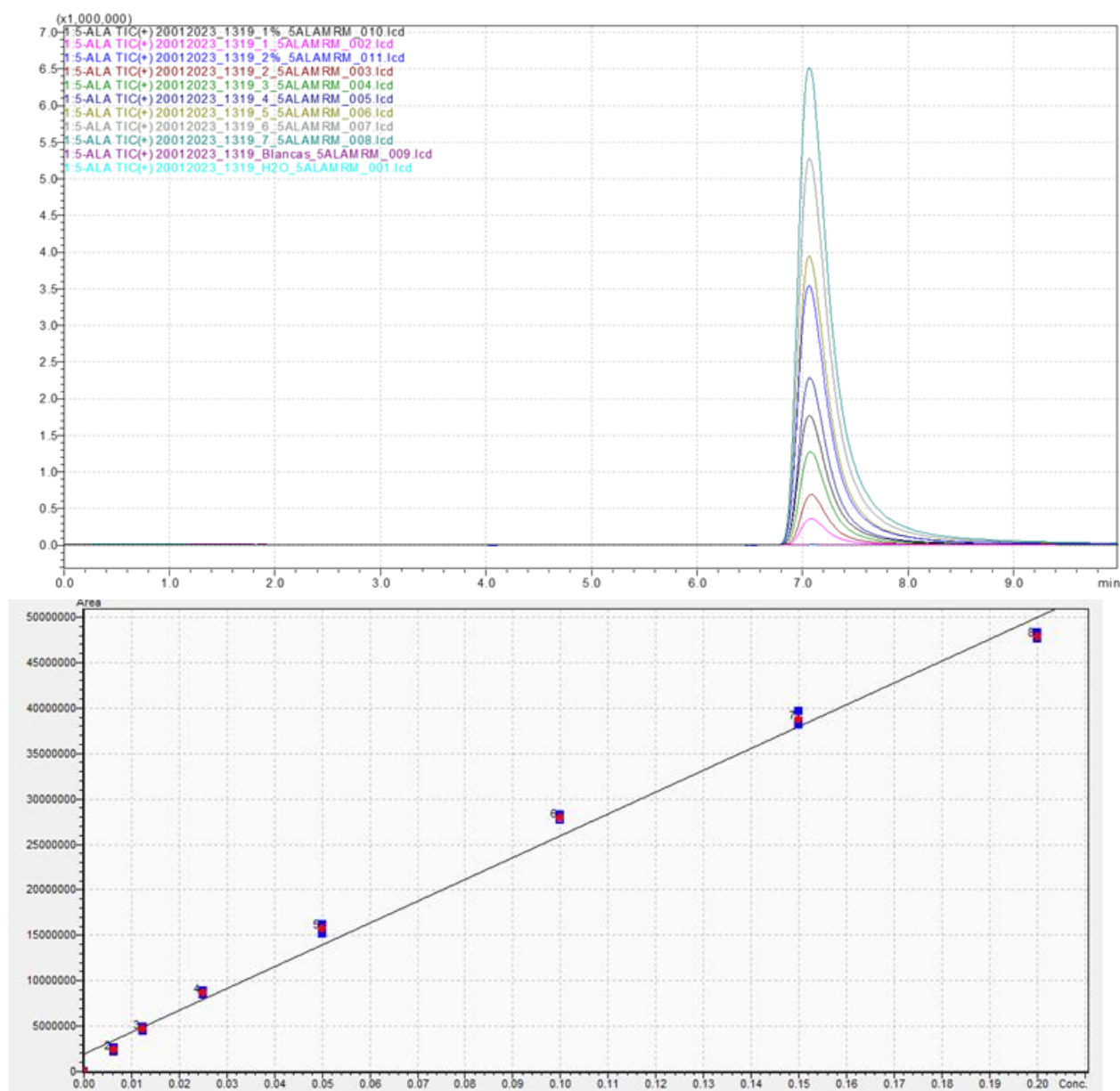
*transportadores para aplicaciones biomédicas* “[20]. El método utilizado en este estudio es isocrático con una fase móvil del 98% de agua con ácido fórmico al 0,1% v/v y un 2% de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% v/v, a un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 1 µL con un tiempo de duración del análisis de 10 minutos. Las muestras fueron inyectadas por triplicado.

Se optimizaron los parámetros del espectrofotómetro de masas de manera automático con la herramienta *Optimization for method* del software Labssolutions, dando lugar a eventos MRM (del inglés *multiple reaction monitore*). MRM selecciona el ion parenteral del 5-ALA ionizado en el primer cuadrupolo del instrumento, lo fragmenta en la celda de colisión y después escoge los fragmentos en el tercer cuadrupolo, seleccionando una transición del ion parenteral a otro. La transición utilizada para la recta patrón y muestras fue 132.15 > 86.10 m/z.

Para el ensayo cromatográfico se realizó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de 5-ALA en agua (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/mL) realizadas por triplicado. Cada punto de la curva de calibrado corresponde, por tanto, a la media de la señal de 5-ALA detectada, cuantificada como el área comprendida entre el pico de cada señal de 5-ALA y la señal basal (Figura 11 A y B).

**Tabla 2.** Curva de calibrado.

| TIPO DE CURVA | ECUACIÓN                          | R <sup>2</sup> |
|---------------|-----------------------------------|----------------|
| LINEAL        | Y = 2.40181E008X +<br>1.93694E006 | 0,992          |



**Figura 11.** A) Perfil cromatográfico de la curva de calibrado de 5-ALA y las muestras analizadas. B) Curva de calibrado del 5-ALA (Y: área, X: concentraciones (mg/mL)), usada para calcular la eficiencia de encapsulación en las nanopartículas.

Las muestras cuantificadas pertenecen al sobrenadante obtenido en el último paso de del proceso de síntesis de nanopartículas correspondiente a la purificación.

Por tanto, se cuantifica la cantidad de 5-ALA que no se ha encapsulado y que se encuentra en el sobrenadante, y por diferencia con la cantidad inicial añadida se determina la cantidad de 5-ALA en las nanopartículas.

Una vez obtenida la cantidad de 5-ALA que se ha encapsulado, se calcula la eficiencia

de encapsulación (EE%), que consiste en la relación entre la cantidad de 5-ALA inicial ( $Q_0$ ) utilizado para la síntesis de las nanopartículas, y la cantidad final ( $Q_F$ ) obtenida por HPLC, siguiendo la siguiente fórmula:

$$EE\% = \frac{Q_F}{Q_0} \cdot 100$$

### 3.6. Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión o TEM (del inglés Transmission Electron Microscopy) utiliza los electrones transmitidos, es decir, que atraviesan la muestra para crear una imagen. Esta técnica ofrece información valiosa sobre la estructura interna de la muestra, estructura cristalina, morfología, información sobre la tensión... En este trabajo se utiliza esta técnica con el objetivo de confirmar la formación de nanopartículas y su tamaño, que previamente ha sido obtenido por DLS, y poder describir su morfología.

Para ello, se prepara una disolución 1:500 de las nanopartículas. Se alicuotan 5  $\mu$ L de dicha disolución sobre una rejilla de cobre de 3 mm de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, UK) y se deja secar durante 24h. El equipo utilizado fue el microscopio electrónico de transmisión Jeol 1011 (Jeol, Japan).

### 3.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo o SEM (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscop, SIGMA 300 VP de ZEISS) produce una imagen ampliada utilizando un haz de electrones en lugar de luz para formar una imagen.

Se detectan los electrones reflejados o golpeados proporcionando información sobre la superficie de la muestra y su composición. La imagen posteriormente es

media mediante el programa ImageJ para conocer los tamaños de las nanopartículas y nanofibras sintetizadas.

Para realizar SEM en las muestras de nanopartículas, se prepara una disolución 1:500 de las nanopartículas. Se alicuotan 2 µL de dicha disolución sobre una oblea de silicio y se deja secar 24h.

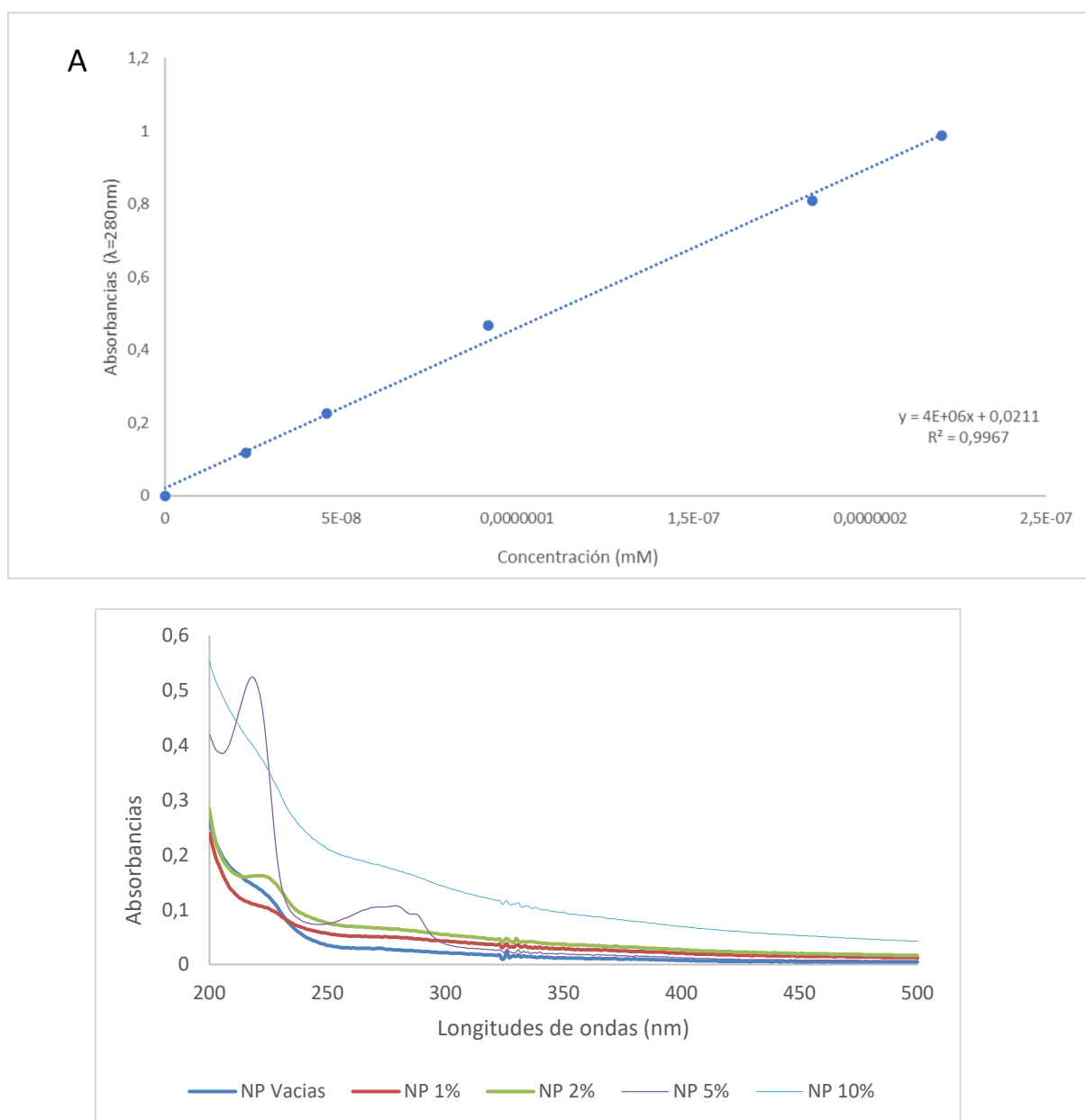
### 3.8. Espectrometría de Absorción

La espectrometría de absorción engloba a una variedad de técnicas que emplean la interacción de la radiación electromagnética con la materia. En esta técnica se compara la intensidad de un haz de luz medida antes y después de la interacción con una muestra. Las palabras transmisión y remisión se refieren a la dirección de viaje de los haces de luz medidos antes y después de la absorción. Las descripciones experimentales asumen que hay una única dirección de incidencia de la luz sobre la muestra, y que un plano perpendicular a esta dirección pasa por la muestra. En la transmisión, la luz es dispersada desde la muestra hacia un detector en el lado opuesto de la muestra. En la remisión, la luz es dispersada desde la muestra hacia un detector en el mismo lado de la muestra.

En este estudio se ha utilizado la espectrometría UV-visible, que hace referencia a técnicas donde se mide cuánta luz de una longitud de onda particular (color) es absorbida por una muestra ya que el color a menudo puede correlacionarse con la presencia y/o la estructura de una sustancia química particular. En este estudio, el aminoácido utilizado L-triptófano presenta una banda característica en el espectro de absorción en UV-visible a 280 nm, permitiendo conocer su concentración (EE%) por diferencia entre lo analizado (sobrenadante) y lo añadido en la síntesis .

$$EE\% = \frac{Q_F}{Q_0} \cdot 100$$

Para el ensayo se realizó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de L-Triptófano en agua (0,000000023, 0,000000046, 0,000000092, 0,000000184, 0,000000220 mM). De cada punto de la curva de calibrado y de cada una de las muestras se realizó un barrido entre las longitudes de onda 500-200 nm, obteniendo así un espectro completo de absorbancia para comprobar si nuestro polímero interfiere en la curva de absorción. (Figura 12 A y B).



**Figura 12. A)** Curva de calibrado de L-Triptófano en agua **B)** Espectro de absorción del sobrenadante de nanopartículas de triptófano (NP) a diferentes concentraciones.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de las nanopartículas y las nanofibras poliméricas

#### 4.1.1 Tamaño y morfología de las nanopartículas

Estudios previos del laboratorio, pusieron a punto un protocolo de síntesis de nanopartículas esféricas con una cantidad inicial de PMVEMA-ES de 100 mg, de forma que la concentración final del polímero en la suspensión de nanopartículas sería 10 mg/mL. Como el polímero comercial utilizado se encuentra al 50% en etanol, nuestra concentración final de polímero sería de 50 mg/10 ml.

Para iniciar este trabajo se sintetizaron nanopartículas de polímero vacías y nanopartículas de polímero con 5-ALA y L-triptófano para así poder comprobar la encapsulación de un compuesto y observar cómo esta afectaría a su tamaño.

En la sección de metodología, anteriormente descrita, aparecen las cantidades de 5-ALA y L-triptófano añadidas en las diferentes disoluciones de nanopartículas. En ambos casos, se midió el tamaño mediante espectroscopía de correlación de fotones (DLS) y su potencial Z (PZ) correspondiente.

**Tabla 3:** Tamaños nanopartículas poliméricas con 5-ALA

| TIPO DE NP | DIAMETRO (nm) | PZ (mV)      |
|------------|---------------|--------------|
| vacías     | 208.8 ± 54.43 | -30.7 ± 6.48 |
| 1%         | 215.9 ± 87,27 | -33.7 ± 6.38 |
| 2%         | 613.3 ± 130.1 | -20.6 ± 6.43 |
| 5%         | 813.3 ± 324.2 | -19.5 ± 6.91 |

**Tabla 4:** Tamaños nanopartículas poliméricas con L-Triptófano.

| TIPO DE NP | DIAMETRO (nm) | Pz (mV)      |
|------------|---------------|--------------|
| Vacías     | 205.5 ± 54.39 | -36.5 ± 6.40 |
| 1%         | 200.3 ± 50.46 | -33.7 ± 4.49 |
| 2%         | 173.7 ± 47.42 | -33.7 ± 5.22 |
| 5%         | 205.5 ± 54.95 | -30.2 ± 5.91 |
| 10%        | 195.2 ± 53.95 | -30.5 ± 6.18 |

En las nanopartículas de 5-ALA se aprecia un aumento del tamaño de la nanopartícula conforme aumentamos la cantidad de compuesto activo encapsulado.

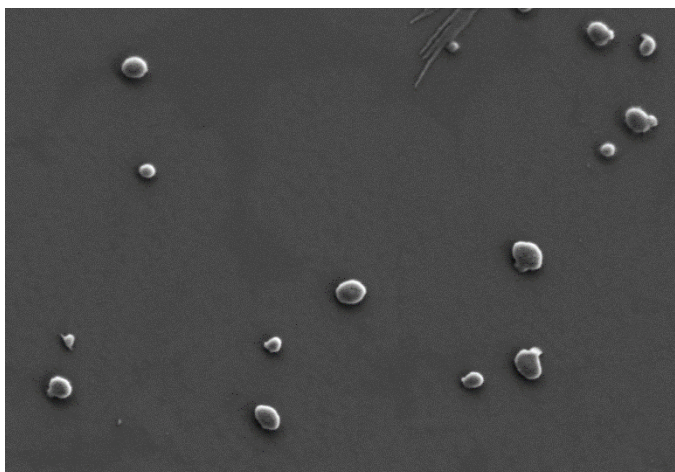
La polidispersión (PDI) es una medida de la homogeneidad de las poblaciones. Según las especificaciones del equipo utilizado, los valores de PDI < 0.2 nos dicen que es una población homogénea. Según esto en las poblaciones preparadas hay mucha homogeneidad.

El potencial Z es una magnitud electroestática de doble capa interfacial de una partícula con su entorno. El signo entre cargas de las partículas corresponde a la atracción o repulsión entre estas cargas y uno de los parámetros claves a tener en cuenta para ver como se ve afectaba la estabilidad de las nanopartículas.

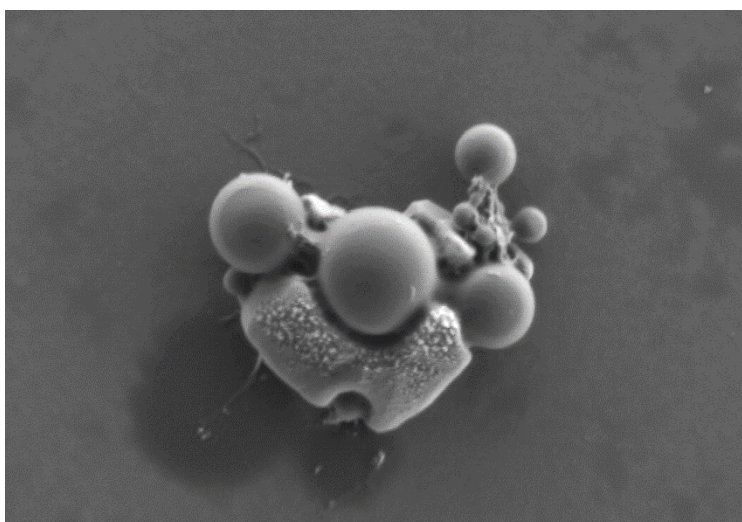
Los potenciales Z tienen todos datos parecidos. Todos ellos son datos negativos para las distintas formulaciones, sus valores oscilan entre -20 mV y -35 mV.

La morfología de las nanopartículas se comprobó diluyendo las nanopartículas 1:500 en el caso de las NP de triptófano y 1:200 en las NP de 5-ALA, y realizando SEM para poder obtener un plano más representativo de su tamaño y morfología.

(Figura 13 y 14)



**Figura 13: Nanopartículas de PMEVA-Es 1% en L-triptófano.** Escala a 400 nm.



**Figura 14: Nanopartículas de PMEVA-Es 1% en 5-ALA.** Escala a 300 nm.

**Tabla 5:** Tamaños Nanopartículas PMEVA-Es 1% en L-Triptófano.

| TIPO DE NP | Media (nm) |
|------------|------------|
| 1%         | 383.813    |

**Tabla 6:** Tamaños Nanopartículas PMEVA-Es 1% en 5-ALA.

| TIPO DE NP | Media (nm) |
|------------|------------|
| 1%         | 168.519    |

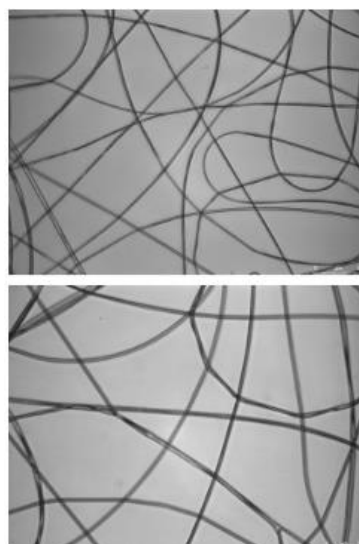
#### 4.1.2 Tamaño y morfología de las nanofibras

Las nanofibras se elaboraron mediante electrospinning con sus respectivas condiciones experimentales y se caracterizaron inicialmente mediante microscopía óptica.

Se prepararon nanofibras de PMVEMA-Es como control a partir de una disolución de PMVEMA-ES 25% p/p y se analizaron mediante microscopía óptica, observando que se obtenían nanofibras sin defectos.

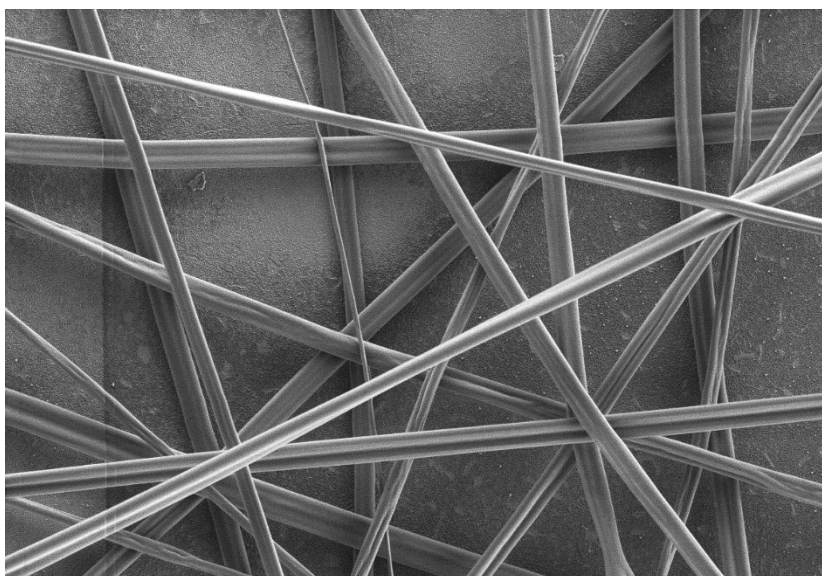
Las nanofibras de PMVEMA-ES de L-triptófano se realizaron a partir de una disolución de PMVEMA-ES 25% p/p con 0,5% de L-triptófano respecto al polímero.

En la Figura 15, se muestran dos imágenes a distintos aumentos de las nanofibras sintetizadas.



**Figura 15: Nanofibras de PMEVA-Es 0.5% en L-triptófano.** Aumento a 40x, 63 x.

Posteriormente estas nanofibras fueron estudiadas con más detalle en SEM. Mediante esta técnica podemos analizar la homogeneidad de las fibras y obtener un plano más representativo ya que estas imágenes se pueden observar con un nivel de resolución mayor al microscopio óptico (Figura 16).

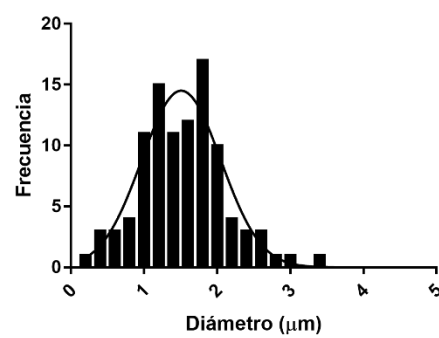
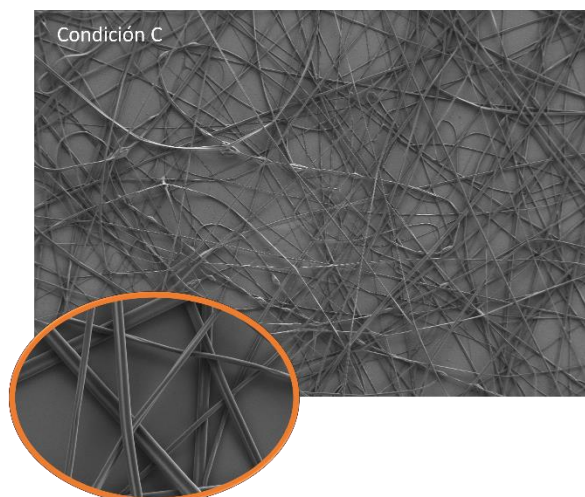
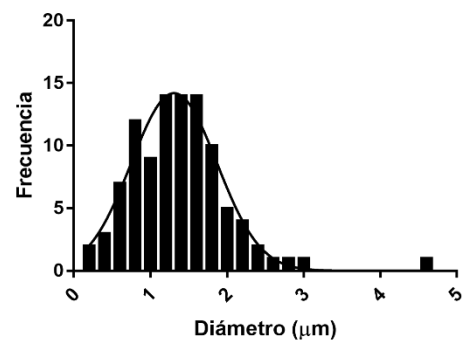
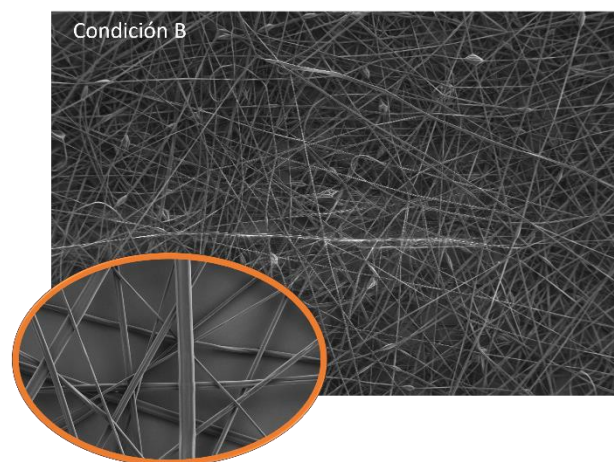
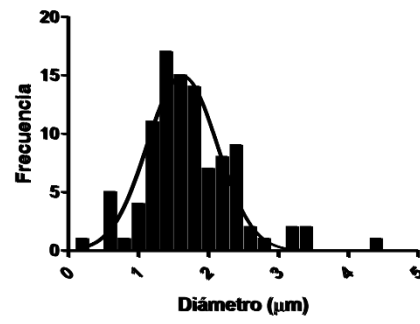
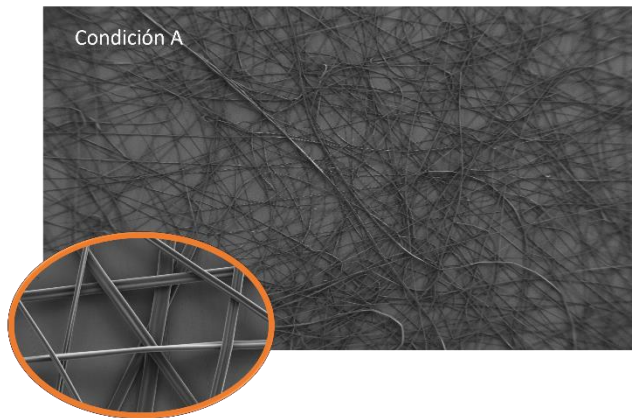


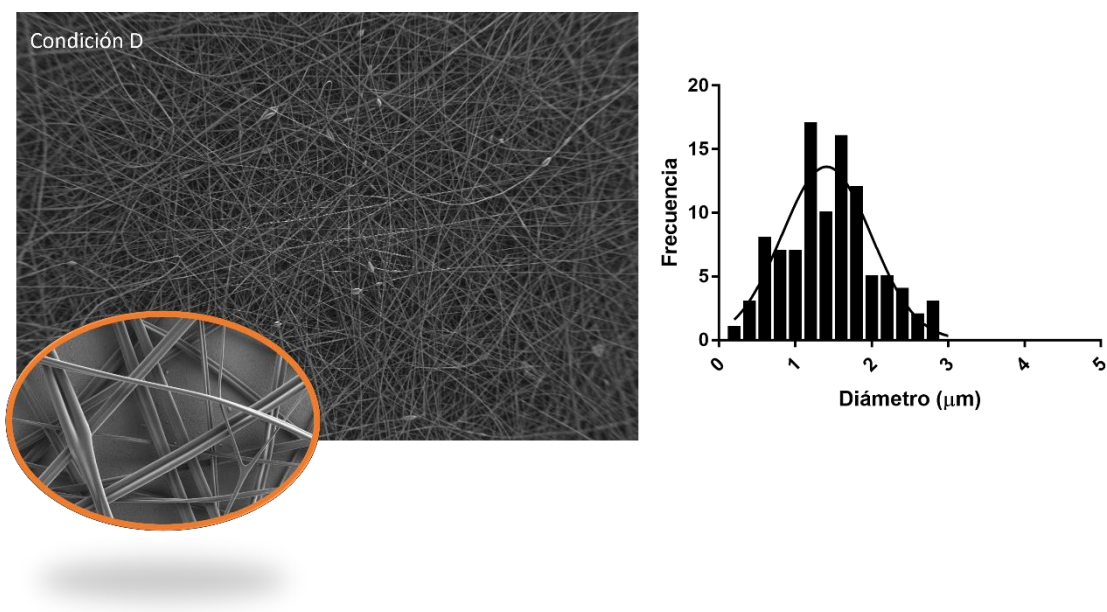
**Figura 16: Nanofibras de PMEVA-Es 0.5% en L-triptófano.** Escala a 5  $\mu\text{m}$ .

Se realizaron nanofibras con una concentración 0.5% de L-Triptófanoa diferentes condiciones para encontrar las condiciones óptimas de síntesis de nanofibras homogéneas.

**Tabla 7:** Condiciones para la síntesis de nanofibras de PMEVA-Es 0.5% L-Triptófano.

| Condición | Voltaje<br>(Kv) | Distancia<br>(cm) | Flujo<br>(ml/h) | Media<br>( $\mu\text{m}$ ) |
|-----------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------------------|
| A         | 17              | 10                | 0.05            | 1,71707                    |
| B         | 17              | 12                | 0.05            | 1,36992                    |
| C         | 17              | 14                | 0.05            | 1,52844                    |
| D         | 18              | 12                | 0.05            | 1,45021                    |





## 4.2. Eficiencia de encapsulación de las nanopartículas

### 4.2.1. Nanopartículas de PMEVA-Es con 5-ALA

Con el HPLC se determinó la eficacia de encapsulación, con la que cuantificamos el profármaco 5-ALA encapsulado en la nanopartícula polimérica.

El cálculo de la eficacia de encapsulación se realizó analizando la concentración de 5-ALA en los sobrenadantes de cada una de las muestras y fue calculada utilizando la recta de calibrado descrita en materiales y métodos de este trabajo.

Los resultados de eficiencia de encapsulación obtenidos se representan en la siguiente tabla.

**Tabla 8:** Eficacia de encapsulación [5-ALA]

| NP | [5-ALA]<br>(mg/ml) | EF (%) |
|----|--------------------|--------|
| 1% | 0,0420             | 20%    |
| 2% | 0.0953             | 10%    |

#### 4.2.2. Nanopartículas de PMEVA-Es con L-triptófano

Con el espectrofotómetro de ultravioleta / visible se calculó la eficacia de encapsulación del triptófano en nanopartículas poliméricas.

El cálculo de la eficacia de encapsulación se realizó midiendo los sobrenadantes de las muestras de NP dializadas para calcular la cantidad de triptófano no encapsulado. La concentración de triptófano en cada una de las muestras fue calculada utilizando la recta de calibrado descrita en materiales y métodos de este trabajo.

**Tabla 9:** Eficacia de encapsulación [L-Triptófano]

| NP  | Longitud de onda (nm) | [L-Triptófano] (mM) | EF (%) |
|-----|-----------------------|---------------------|--------|
| 1%  | 279                   | 0.0499              | 79.6   |
| 2%  | 279                   | 0.0649              | 73.5   |
| 5%  | 279                   | 0.1069              | 56.3   |
| 10% | 279                   | 0.1729              | 29.4   |

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo de fin de grado, se llevó a cabo una comparativa del método de purificación de nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas sintetizadas de 5-ALA se realizaron mediante centrifugación en combinación con la puesta a punto de un método de fabricación de nanopartículas poliméricas por dialización para encapsular L-triptófano. Además se realizaron nanofibras de triptófano.

En la actualidad hay publicados diversos trabajos en los que encapsulan 5-ALA, en liposomas o nanopartículas de polisacáridos para el tratamiento del melanoma y el acné, pero no se han encontrado referencias que utilicen el polímero que se utiliza en este trabajo, el PMVEMA-ES, como agente encapsulador del 5-ALA.

Para la producción de nanopartículas se empleó una modificación del método de desplazamiento de disolvente, aplicado anteriormente en nuestro laboratorio. El objetivo de aplicar esta síntesis era valorar la diferencia entre el paso final, la purificación, analizando si era óptimo utilizar el método de centrifugación o la diálisis

empleada en las nanopartículas de triptófano. Hasta ahora en el laboratorio se había empleado la centrifugación y se pretendía ver si la diálisis mejoraba el tamaño de las nanopartículas.

Según podemos observar en los resultados cuando desarrollamos las diferentes nanopartículas de 5-ALA mediante centrifugación se obtienen tamaños que fluctúan entre 200 nm y 800 nm con polidispersiones mayores a 0.3 para unas cargas de 1,2 y 5% de 5-ALA con respecto al polímero.

Sin embargo, cuando realizamos las nanopartículas de L-triptófano mediante diálisis, los tamaños de las nanopartículas oscilan entre 200-300 para las mismas concentraciones, pero en este caso, las polidispersiones son inferiores a 0.3.

Por tanto, al realizar esta comparativa entre ambos métodos de purificación, se observa que al realizarse el método de centrifugación e intentar resuspender el pellet en agua es prácticamente imposible ya que el PMEVA-Es no es soluble en agua. Por ello, no se consigue resuspender una cantidad suficiente para obtener una medida ya que hay poca cantidad de nanopartículas frente a gran cantidad de agua, obteniéndose así una polidispersión mayor de 0.3.

Tras analizar los tamaños, nos fijamos en los potenciales zeta, una medida de la magnitud de la doble capa interfacial de las nanopartículas con su entorno. El signo negativo o positivo indica la atracción (positivo) o repulsión (negativo) entre las cargas. Es un parámetro clave a tener en cuenta para saber cómo afecta la estabilidad de las nanopartículas, por tanto, el potencial zeta nos indica el grado de estabilidad eléctrica, unos valores cercanos a cero nos indican que las partículas tenderán a precipitar mientras que si los valores son lejanos en valor absoluto indican estabilidad y que no tenderán a agregarse.

Todas las nanopartículas desarrolladas, presentan valores de potencial zeta altos y con ello podemos ver que presentan estabilidad en medios dispersos. Estos valores son muy similares a estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio y a compuestos de mono ésteres [28].

Tras analizar las medidas fisicoquímicas se pasó a ver si la eficacia de encapsulación, es decir, la cantidad de 5-ALA y de aminoácido que se había encapsulado. Este proceso se llevó a cabo mediante técnicas analíticas diferentes. Siendo la

cromatografía con detector MS/MS para el 5-ALA como se indica en apartados anteriores y espectroscopia de UV-Visible para la cuantificación de L-triptófano, ya que este compuesto presenta absorción máxima a una longitud de onda de 280 nm siendo factible su análisis mediante esta técnica. En trabajos anteriores la cantidad de 5-ALA encapsulado, se calculó mediante detector de ELSD y actualmente, en este trabajo mediante MS/MS. El 5-ALA tuvo una eficacia de encapsulación entorno al 30% en consonancia con un proyecto anteriormente llevado a cabo en el laboratorio. Por su parte, el L-triptófano presentó una eficacia de encapsulación entre el 30 y el 80 % siendo el 30% para un 10% de carga de aminoácido y el 80% para el 1% de carga. Por último, las nanopartículas fueron caracterizadas por FSEM. Esta técnica nos permite hacer un barrido de la muestra para observar la homogeneidad y ver un plano representativo, además de ver en detalle la morfología y poder medir el diámetro real de las partículas.

Se realizaron fotos de nanopartículas de 5-ALA al 1% p/p centrifugadas para ver exactamente que se cumplía la hipótesis de que existía algo agregado y por ello obteníamos esos valores de polidispersiones y mayores tamaños. Por lo que se puede observar en la figura 14 parece que hay nanopartículas pegadas a polímero suelto o roto al intentar despegar el pellet. Por el contrario, en las nanopartículas de triptófano al 1% p/p se observan las nanopartículas sueltas y separadas (Figura 13).

En la parte de desarrollo de nanofibras cargadas con L-triptófano se desarrolló el método puesto a punto anteriormente en la tesis doctoral de Amalia Mira pero en este caso con el aminoácido citado [20].

Los desarrollos de nanofibras de triptófano fueron con cargas de 0.5%, 1%, 5% y 10%. Las disoluciones al 5 y 10% no pudieron llevarse a cabo porque el aminoácido precipitaba. Las disoluciones al 1% no se conseguía obtener del todo homogénea pero las disoluciones del 0.5 % estaban perfectamente disueltas y es en la que se centraron los cálculos de tamaños y posteriormente caracterización por FSEM.

Los tamaños de las nanofibras fluctuaron entre 1 micra y 2 micras, siendo por tanto unas fibras micrométricas heterogéneas.

En el FSEM se observa que son de superficie lisa y sin malformaciones como pueden ser nudos o bits.

## 6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA

La utilización de 5-ALA y L-triptófano como tratamiento oral para diversos cánceres y para tratamientos del sueño o para destino en piscifactorías respectivamente puede ocasionar efectos no deseados en los pacientes, en el caso de la vía oral o transdérmica en humanos. En este Trabajo de Fin de Grado, se han diseñado y desarrollado sistemas nanoestructurados de encapsulación de dos compuestos para ser incorporados en formas galénicas orales (5-ALA) o vía transdérmica (L-triptófano). La intención de estas formas farmacéuticas sobre cualquier enfermedad es la de activar de forma controlada la administración de fármaco pudiendo así aportar una mejora en la calidad de vida del paciente al reducir los posibles efectos secundarios producidos por vía oral. Con este objetivo, se utilizó el derivado éster del poli (metil vinil éter-alt-anhídrido maleico), (PMVEMA-ES), como polímero matriz, por sus características biocompatibles, biodegradables y transportadoras.

Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. Las nanopartículas de 5-ALA presentan mayor PDI tras una purificación por centrifugación.
2. Las nanopartículas de L-triptófano mediante diálisis encapsulan un porcentaje superior al 30%.
3. El método de diálisis genera poblaciones de nanopartículas más homogéneas.
4. Se ha utilizado una disolución polimérica de PMVEMA-ES 25% p/p como polímero matriz para la producción de nanofibras mediante la técnica de electrohilatura para encapsular L-triptófano.
5. El tamaño y morfología de las nanofibras dependieron de los parámetros experimentales y también de la estructura del aminoácido encapsulado.
6. La eficacia de encapsulación (EE%) en la nanofibra debería haberse cuantificado con una muestra de la disolución inicial, diluida en base a la cantidad teórica añadida para entrar dentro del rango de la curva de calibrado. Con ese dato se partiría para cuantificar la liberación. Por tanto, quedaría pendiente para futuros trabajos.
7. Optimizando la encapsulación de las nanopartículas se podrían desarrollar ensayos in vitro.

8. Conociendo la encapsulación de las nanofibras, se procedería a los ensayos de liberación mediante celdas de Franz ya los estudios in vitro.

Con este trabajo se ha pretendido optimizar la forma de fabricación de nanopartículas en el laboratorio para mejorar el proceso con el polímero utilizado y además, desarrollar una nueva forma de administración de un aminoácido de aplicación cutánea o en piscifactorías.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Vasir, J. K. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 718-728, doi:10.1016/j.addr.2007.06.003 (2007).
2. Langer, R. & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **428**, 487-492, doi:10.1038/nature02388 (2004).
3. Gunn, J. & Zhang, M. Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. *Trends in biotechnology* **28**, 189-197 (2010).
4. Vasita, R. & Katti, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of nanomedicine* **1**, 15 (2006).
5. Guo, G., Fu, S., Zhou, L., Liang, H., Fan, M., Luo, F., Qian, Z. & Wei, Y. Preparation of curcumin loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers and their in vitro antitumor activity against Glioma 9L cells. *Nanoscale* **3**, 3825-3832 (2011).
6. Yoo, J. J., Kim, C., Chung, C.-W., Jeong, Y.-I. & Kang, D. H. 5-aminolevulinic acid-incorporated poly (vinyl alcohol) nanofiber-coated metal stent for application in photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine* **7**, 1997-2005 (2012).
7. Merkel, O. M., Marsh, L. M., Garn, H. & Kissel, T. Flow cytometry-based cell type-specific assessment of target regulation by pulmonary siRNA delivery. *Methods in Molecular Biology* **948**, 263-273, doi:10.1007/978-1-62703-140-0\_18 (2013).
8. Andrianantoandro, E. Next-generation therapeutics. *Trends in biotechnology* **32**, 431-432 (2014)

9. Sumerlin, B. S. & Vogt, A. P. Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules*, 1-13, doi: 10.1021/ma901447e (2010).
10. Zhang, X., Zhang, Y., Liu, X., Fang, A., Li, P., Li, Z., Liu, T., Yang, Y., Du, L. & Wang, C. MicroRNA-203 Is a Prognostic Indicator in Bladder Cancer and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin via Apoptosis by Targeting Bcl-w and Survivin. *PLoS One* **10**, e0143441, doi:10.1371/journal.pone.0143441 (2015).
11. Teixeira, A. I., Duckworth, J. K. & Hermanson, O. Getting the right stuff: controlling neural stem cell state and fate in vivo and in vitro with biomaterials. *Cell research* **17**, 56-61 (2007).
12. Kwon, G. S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **20**, 357-403 (2003).
13. Ma, B., Xie, J., Jiang, J., Shuler, F. D. & Bartlett, D. E. Rational design of nanofiber scaffolds for orthopedic tissue repair and regeneration. *Nanomedicine* **8**, 1459-1481 (2013).
14. Eap, S., Keller, L., Schiavi, J., Huck, O., Jacomine, L., Fioretti, F., Gauthier, C., Sebastian, V., Schwinté, P. & Benkirane-Jessel, N. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *International journal of nanomedicine* **10**, 1061 (2015).
15. Xie, J., Li, X. & Xia, Y. Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research. *Macromolecular rapid communications* **29**, 1775-1792 (2008).
16. Zhang, L., Yan, J., Yin, Z., Tang, C., Guo, Y., Li, D., Wei, B., Xu, Y., Gu, Q. & Wang, L. Electrospun vancomycin-loaded coating on titanium implants for the prevention of implant-associated infections. *International journal of nanomedicine* **9**, 3027 (2014).
17. Hsu, Y.-H., Chen, D. W.-C., Tai, C.-D., Chou, Y.-C., Liu, S.-J., Ueng, S. W.-N. & Chan, E.-C. Biodegradable drug-eluting nanofiber-enveloped implants for sustained release of high bactericidal concentrations of vancomycin and ceftazidime: in vitro and in vivo studies. *International journal of nanomedicine* **9**, 4347 (2014).
18. Gómez A. (2014). Desarrollo y optimización de nanofibras de PMVEMA-H mediante electrospinning (Trabajo fin de Máster). Universidad Miguel Hernández. Elche.

19. Arias 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.
20. Mira Carrió A. (2017). Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas (Tesis Doctoral). Universidad Miguel Hernández. Elche.
21. Mira A, Sainz-Urruela C, Codina H, et al. Physico-Chemically Distinct Nanomaterials Synthesized from Derivates of a Poly(Anhydride) Diversify the Spectrum of Loadable Antibiotics. *Nanomaterials* (Basel). 2020;10(3):486. Published 2020 Mar 8. doi:10.3390/nano10030486
22. Mira, A., Mateo, CR, Mallavia, R. y Falco, A. (2017). Poli (ácido metil vinil éter-alt-maleico) y monoéster etílico como polímeros de construcción para nanofibras electrohiladas cargables con fármacos. *Informes científicos* , 7 (1), 17205. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17542-4>
23. Martínez-Ortega, L., Mira, A., Fernandez-Carvajal, A., Mateo, C. R., Mallavia, R., & Falco, A. (2019). Development of A New Delivery System Based on Drug-Loadable Electrospun Nanofibers for Psoriasis Treatment. *Pharmaceutics*, 11(1), 14.
24. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(4): p. 250-281.
25. Kim, C.H., et al., *Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**: p. 1357. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009 Mar 23;2:45-60. doi: 10.4137/ijtr.s2129. PMID: 20651948; PMCID: PMC2908021.
26. Le Floc'h N, Otten W, Merlot E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*. 2011 Nov;41(5):1195-205. doi: 10.1007/s00726-010-0752-7. Epub 2010 Sep 25. PMID: 20872026.
27. Le Floc'h N, Otten W, Merlot E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*. 2011 Nov;41(5):1195-205. doi: 10.1007/s00726-010-0752-7. Epub 2010 Sep 25. PMID: 20872026.
28. Salman HHA, Azcarate IG. (US 20140161892 A1, Juny 12, 2014).