



# FACULTAD DE FARMACIA

## GRADO EN FARMACIA

# DESARROLLO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS DE GLUTATION REDUCIDO PARA EVALUAR DIFERENTES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN.

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2024

**Autor:** Jasmine Balala Rojo

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Ricardo Mallavia Marín, Amalia Mira Carrio

## Resumen:

El uso de nanofibras, para encapsular metabolitos, es una práctica cada vez más común y objeto de investigación por sus propiedades. Aumentan la superficie de contacto del fármaco que encapsula lo que mejora la absorción de este. El objetivo de este trabajo es la encapsulación de glutation reducido mediante la elaboración de nanofibras con poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico) (PMVEMA-Ac) y poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-Es). Para su caracterización se emplearon diferentes técnicas. Con microscopía óptica y electrónica (FSEM) se evaluó el aspecto, que fue homogéneo para las elaboradas con PMVEMA-Ac y heterogéneo para PMVEMA-Es, y los diámetros de las fibras obtenidas que fueronde  $318 \pm 30$  nm para las de PMVEMA-Ac y de  $667 \pm 169$  nm para PMVEMA-Es. Además, se realizó la medida de las viscosidades de las disoluciones poliméricas y se vió que eran electrohilables. Por espectroscopía infrarroja se analizó que había glutation encapsulado de forma cualitativa y se cuantificó realizando una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por último, un ensayo *in vitro* de degradación de la nanofibra a diferentes pH, permitió evaluar, de manera cualitativa, que la fibra se había degradado y cuantitativamente cuánto se liberó de metabolito a diferentes horas.

Palabras clave: nanofibras, glutation, HPLC, infrarrojo, FSEM, *electrospinning*, microscopía, degradación, viscosidad, PMVEMA.

## Abstract:

The use of nanofibers to encapsulate metabolites is an increasingly common practice and the subject of research due to its properties. They increase the contact surface of the encapsulating drug, which improves drug absorption. The aim of this work is the encapsulation of reduced glutathione by the elaboration of nanofibers with poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) (PMVEMA-Ac) and poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) (PMVEMA-Es). Different techniques were used to characterize them. Optical and electron microscopy (FSEM) was used to evaluate the appearance, which was homogeneous for those made with PMVEMA-Ac and heterogeneous for PMVEMA-Es, and the diameters of the fibers obtained, which were  $318 \pm 30$  nm for those with PMVEMA-Ac and  $693 \pm 26$  nm for

PMVEMA-Es. In addition, the viscosities of the polymeric solutions were measured and it was found that they were electrospinnable. Infrared spectroscopy was used to analyze the qualitatively encapsulated glutathione and quantified it by performing high-performance liquid chromatography (HPLC). Finally, an in vitro test of nanofiber degradation at different pH allowed us to evaluate, qualitatively, that the fiber had degraded and quantitatively how much metabolite was released at different times.

Keywords: nanofibers, glutathione, HPLC, infrared, FSEM, electrospinning, microscopy, degradation, viscosity, PMVEMA.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Vías de aplicación.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Relevancia de las nanofibras en la actualidad.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Técnica de electrohilado .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Propiedades de los polímeros.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.1 Poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico) PMVEMA-Ac.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.2 Poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) PMVEMA-Es.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Nanofibras para la encapsulación de principios activos.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.1 Glutation (GLU).....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Reactivos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Soluciones poliméricas.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Viscosidad.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Electrohilado.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Análisis morfológico de las fibras.....</b>	<b>17</b>
<b>3.5.1 Microscopía óptica.....</b>	<b>17</b>
<b>3.5.2 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....</b>	<b>17</b>
<b>3.6 Determinación cualitativa: Espectroscopía infrarroja.....</b>	<b>17</b>
<b>3.7 Determinación cuantitativa: Cromatografía líquida de alta resolución.....</b>	<b>18</b>
<b>3.7.2 Recta de calibrado.....</b>	<b>19</b>
<b>3.8 Ensayo <i>in vitro</i>: tiempo de degradación de la nanofibra.....</b>	<b>20</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>

<b>4.1 Determinación de la viscosidad.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Morfología de las nanofibras .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1 Nanofibras de PMVEMA-Ac.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2 Nanofibras de PMVEMA-Es.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Evaluación cualitativa de las nanofibras.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Evaluación cuantitativa de las nanofibras.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5 Ensayo <i>in vitro</i> de tiempo de degradación de la nanofibra.....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Distintas vías de aplicación

Existe una gran variedad de vías de administración de medicamentos. Entre estas, se distingue la vía enteral y la parenteral. En cuanto a la primera, la vía oral es la más utilizada tradicionalmente a pesar de que la biodisponibilidad de ésta puede verse disminuida debido a la metabolización presistémica producida por el primer paso hepático <sup>(1)</sup>. Otra vía en la que los fármacos sufren el primer paso hepático es la rectal, pero en menor medida que en la vía oral <sup>(2)</sup>.

Entre las vías parenterales destaca por su exactitud en la dosis de un fármaco la vía intravenosa. Es una administración que va directamente a la circulación sistémica, aunque tiene como inconveniente la rápida aparición de efectos adversos ocasionados por el fármaco. Otra vía conocida, es la intramuscular que destaca porque la absorción va a depender de la vascularización de la zona donde se inyecta. Por último, nombrar la vía subcutánea, en la que la absorción de fármaco se produce en menor medida aún que en la intramuscular <sup>(3)</sup>.

Existen otras vías de administración como la transdérmica, ótica, vaginal entre otras <sup>(4)</sup>. En la vía transdérmica, el fármaco se aplica directamente sobre la piel, penetra y se libera en la circulación sanguínea. Este tipo de administración permite usar en su favor la capacidad de absorción que tiene la piel. La principal ventaja de esta vía es que evita el primer paso hepático, por lo que no se pierde parte del fármaco en una metabolización presistémica <sup>(5)</sup>. Esta vía puede ser de utilidad en pacientes que tienen dificultades para ingerir de forma oral su medicación <sup>(6)</sup>. En comparación con otras vías convencionales presenta otras ventajas como son: prevenir interacciones medicamentosas con alimentos o bebidas, es indolora y es de naturaleza no invasiva.

Actualmente, la administración de fármacos a través de la piel no se centra únicamente en su aplicación en condiciones de enfermedad, también pueden administrarse para lograr una mejora en la calidad de la piel <sup>(7)</sup>.

## 1.2. Relevancia de las nanofibras en la actualidad

Uno de los métodos que existen para incorporar fármacos en parches es en forma de nanofibra <sup>(8)</sup>. Estas nanofibras son fibras que tienen un diámetro en el rango del nanómetro <sup>(9)</sup> y, hoy día están siendo objeto de investigación por sus propiedades. La principal ventaja de estas nanofibras es que, al tener un tamaño tan pequeño, su superficie de contacto es mayor, por lo que mejora la absorción del fármaco <sup>(8)</sup>. Actualmente, se están utilizando estas nanofibras cargadas de fármaco para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Se elaboran con el agente quimioterapéutico y se aplican de forma local tras la extracción de un tumor como prevención para eliminar remanentes de células tumorales <sup>(10)</sup>.

No solo se están aplicando en la liberación de fármacos, también se usan en liberación de genes, para la elaboración de apósitos y formación de tejidos. Por otra parte, se está investigando con principios hidrófilos, con el objetivo de poder introducirlos en forma de nanofibra, ya que generalmente no tienen una buena absorción en las capas más profundas de la piel <sup>(8)</sup>.

Para la elaboración de nanofibras existen diversos métodos, pero el que más resultado ha dado, ha sido el método del electrohilado, también conocido como *electrospinning* <sup>(8)</sup>. Otros métodos son:

- El autoensamblaje: las moléculas que componen la nanofibra se disponen en estructuras ordenadas unidas de manera no covalente. No es el procedimiento más adecuado ya que es difícil de industrializar y no se controlan bien las dimensiones de la fibra.
- El nanomoldeo: usa un molde poroso nanoestructurado para obtener las fibras <sup>(11)</sup>.

## 1.3. Técnica de electrohilado

El electrohilado, es la técnica de elección debido a que es de fácil uso, es relativamente barata, es ajustable y existe la probabilidad de industrializarla <sup>(8)</sup>. A

pesar de que se había usado con anterioridad, fue en 1934 cuando empezó a cobrar importancia, tras ser patentada por Formhals <sup>(9)</sup>.

La elaboración de estas fibras mediante electrohilado se lleva a cabo con equipos especializados (figura 1). Estos equipos de electrohilatura pueden disponerse de forma vertical u horizontal y tienen diversas partes en su montaje que se describen a continuación <sup>(8)</sup>:

- a) Jeringa con aguja metálica
- b) Campo eléctrico como fuente de alimentación
- c) Colector
- d) Bomba inyección

En este caso, para poder elaborar las nanofibras se usa una jeringa cargada con la solución que contiene el polímero, el fármaco y el disolvente en el que sean solubles los compuestos a utilizar. A esta jeringa se le aplica una aguja metálica por donde van a salir expulsadas las fibras. En este caso hemos usado una bomba de inyección que empuja la jeringa a un flujo constante. La fuente de alimentación está conectada a la aguja y al colector y, es en esta última parte donde se van a recoger las nanofibras elaboradas. Esta unión es lo que conforma el campo eléctrico. Lo que ocurre es que la bomba de inyección empuja la solución de la jeringa a la aguja metálica y la gota que se expulsa se pone en contacto con el campo eléctrico produciéndose una repulsión electrostática ocasionando que aumente la tensión superficial y su forma se transforme en un cono, conocido como el “cono de Taylor”. Desde la punta del cono surge un chorro dirigido al otro extremo del campo eléctrico, donde se encuentra el colector y se recogen las fibras. El chorro sale dirigido hacia esa dirección por la diferencia de cargas entre la aguja y el colector. Las fibras quedan formando un velo en forma sólida debido a que el disolvente que había en la solución se evapora conforme sale el chorro disparado <sup>(13)</sup>. La distancia entre aguja y colector debe ser suficiente para conseguir el secado de las fibras y que se formen correctamente <sup>(14)</sup>.



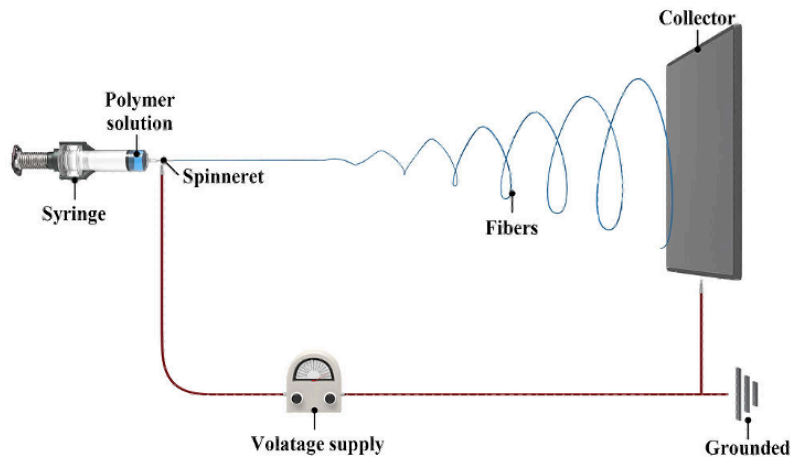


Figura 1: Estructura del método del electrohilado. Fuente: <sup>(13)</sup>

Los parámetros principales a la hora de usar la técnica del electrohilado son:

- El flujo con el que se expulsa la solución polimérica a la jeringa.
- El voltaje aplicado.
- La distancia hasta el colector.
- La volatilidad del solvente y la viscosidad del polímero ya que a más volatilidad y menos viscosidad se obtendrán fibras con un diámetro menor, por tanto, serán más finas <sup>(13)</sup>.

No solo existen estos parámetros de trabajo, también debemos tener en cuenta los ambientales como la temperatura y la humedad relativa que influyen directamente en el resultado de las fibras.

- Un aumento de la temperatura produce fibras más finas ya que existe una relación inversa entre la temperatura y la viscosidad.
- Un aumento de la humedad produce unos poros en la superficie de la fibra <sup>(15)</sup>.

#### 1.4. Propiedades de los polímeros

En la actualidad, los polímeros están en expansión debido a su amplio uso en biomedicina, farmacia o biología molecular entre otros <sup>(16)</sup>. Se utilizan para la ingeniería de tejidos, la cirugía estética y la administración de fármacos <sup>(17)</sup>.

Estos polímeros se obtienen gracias a la unión de monómeros entre sí dando como resultado una cadena polimérica. Este proceso puede darse de forma natural como es en el caso de la celulosa o el caucho natural y, también, de forma artificial obteniéndose polímeros sintéticos <sup>(16)</sup>. Hay diferencias según el tipo de polímero, pero hay una serie de propiedades generales que podemos aplicar en prácticamente todos ellos, entre éstas se encuentran: la alta resistencia, son muy buenos aislantes tanto térmicos como eléctricos, la facilidad de procesamiento y la resistencia a ciertos productos químicos <sup>(18)</sup>.

Precisamente se habla de estos polímeros ya que son uno de los componentes base para poder realizar nanofibras. Se usan para obtener la solución polimérica que, posteriormente al realizar la técnica del electrohilado, se convertirá en un tejido donde se encuentran las nanofibras <sup>(19)</sup>.

#### **1.4.1. Poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico) PMVEMA-Ac**

El poli(metil vinil éter-ácido alt-maleico) (PMVEMA-Ac) (figura 2) es uno de los polímeros usados para la realización de nanofibras electrohiladas de este trabajo de fin de grado. Se ha escogido este polímero por sus propiedades ya que es soluble en agua, tiene un bajo costo, una baja toxicidad, está disponible comercialmente, tiene una gran capacidad adhesiva sin toxicidad <sup>(20)</sup> y es biodegradable <sup>(21)</sup>. Esta adhesividad la adquiere gracias a sus múltiples grupos hidroxilo (-OH) y carboxílicos (-COOH) <sup>(20)</sup>.

El PMVEMA-Ac se obtiene por hidrólisis del poli(metil vinil éter-alt-anhídrido maléico) (PMVEMA-An) <sup>(22)</sup>. No solo se utiliza en la elaboración de nanofibras cargadas con fármaco, también se ha utilizado para la elaboración de nanopartículas <sup>(23)</sup>, para el desarrollo de microagujas transdérmicas biodegradables <sup>(24)</sup>, para la elaboración de micelas cargadas de doxorubicina en el cáncer de mama <sup>(25)</sup> y, por último, en la elaboración de hidrogeles para la administración de fármacos hidrófobos <sup>(26)</sup>.

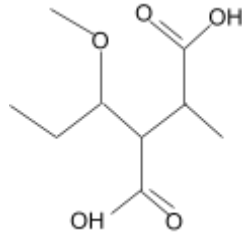


Figura 2: Estructura del (PMVEMA-Ac). Fuente

#### 1.4.2 Poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) PMVEMA-Es

Poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) PMVEMA-Es (figura 3) es el otro polímero usado para la realización de nanofibras en este trabajo. El PMVEMA-Es es biodegradable, posee biomucoadhesividad, baja toxicidad y tiene un bajo costo lo que hace que sea uno de los polímeros de elección. Es soluble en etanol y actúa como formador de película y adyuvante en parches transdérmicos <sup>(27)</sup>. El PMVEMA-Es se obtiene mediante la apertura en etanol del PMVEMA-An <sup>(22)</sup>.

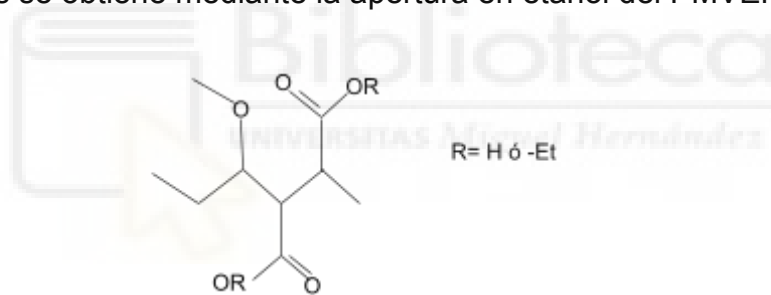


Figura 3: Estructura del (PMVEMA-Es).

### 1.5 Nanofibras para la encapsulación de principios activos

En este trabajo se ha realizado la encapsulación de un principio activo, el glutathion reducido (GLU) mediante la elaboración de nanofibras poliméricas biodegradables y biocompatibles electrohiladas.

#### 1.5.1. Glutathion (GLU)

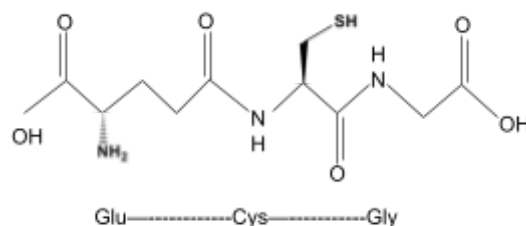
El glutathion (figura 3) es un péptido soluble en agua <sup>(28)</sup> formado por 3 aminoácidos que son la cisteína, el glutamato y la glicina, que se genera en el hígado principalmente <sup>(29)</sup>. En la síntesis de glutathion necesitamos la acción de 2 enzimas que son la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y GSH sintetasa. El glutathion existe

tanto en estado oxidado como reducido y es extremadamente importante que haya un equilibrio entre los dos estados en el organismo <sup>(28)</sup>. El glutathion contiene un grupo tiol ubicado en la cisteína que es el que le concede la capacidad de oxidarse y regenerarse. Esto es una ventaja, ya que le permite participar en gran número de reacciones bioquímicas y farmacológicas <sup>(29)</sup>. Este tiol es un nucleófilo que ataca a sustancias electrófilas tanto endógenas como exógenas. Un ejemplo de esto es la degradación de:

- Las especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas ROS están implicadas en la señalización intracelular y en ciertas patologías humanas, por ello se ha visto que anomalías en la expresión de glutatión se vincula con enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, la fibrosis quística, el envejecimiento y el VIH <sup>(28)</sup>. Las ROS producen daño oxidativo a lípidos de membrana, ADN y proteínas.
- Las especies reactivas del nitrógeno (RNS) que inactivan complejos de la cadena respiratoria e inhiben la síntesis de proteínas y ADN. Las RNS se inactivan o reducen gracias a la acción del glutatión.
- Otros ejemplos son los oxidantes dietéticos, que producen ROS, y los xenobióticos que pueden inducir cáncer.

Entre las funciones del glutathion se encuentran:

- Es uno de los principales antioxidantes intracelulares.
- Controla la proliferación celular y la respuesta inmunitaria.
- Colabora en la transducción de señales intracelular a través del factor nuclear kappaB y la proteína tirosina fosfatasa 1-B <sup>(29)</sup>.



*Figura 4: Estructura del glutathion.*

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo principal

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es la elaboración y caracterización de nanofibras polimérica biodegradables y biocompatibles de glutation usando PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es como polímeros.

### Objetivos secundarios

Entre los escalones secundarios se encuentran:

- La preparación de disoluciones poliméricas de PMVEVA-Ac y PMVEMA-Es con glutation a diferentes concentraciones.
- Estudio de la viscosidad de las disoluciones poliméricas
- Uso adecuado de la técnica del electrohilado para la realización de las nanofibras poliméricas. En este caso de los polímeros PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es mediante los parámetros correctos.
- Análisis morfológico de las fibras mediante obtención de imágenes por microscopía óptica y microscopía electrónica.
- Análisis cualitativo de las nanofibras por espectroscopía infrarroja.
- Análisis cuantitativo de las nanofibras por cromatografía líquida de alta resolución (en inglés High liquid performance chromatography, HPLC).
- *Ensayo in vitro*: tiempo de degradación de la fibra.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Reactivos**

El metabolito utilizado ha sido el glutation reducido con una pureza  $\geq 98\%$  y peso molecular de 307,32 g/mol (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

Los polímeros usados son: el PMVEMA-Ac (Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) de peso molecular bajo 216,000 g/mol (Sigma-Aldrich) y el PMVEMA-Es (Poli (metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) de peso molecular 130,000 g/mol (Sigma-Aldrich).

Entre los disolventes utilizados se encuentran el agua miliQ del equipo Mili-Q Q-Pod (Sigma Aldrich), etanol (Supelco®, Sigma Aldrich) con pureza de  $>99,9\%$  y peso molecular 46,07 g/mol, y acetonitrilo con una pureza  $>99,9\%$  y peso molecular 41,05 g/ml (Honeywell, Charlotte, Carolina del Norte, Estados unidos), tampón de solución pH  $10,00 \pm 0,05$  (20°C) (coloreada de azul) ST, de solución pH  $7,00 \pm 0,05$  (20°C) (coloreada de amarillo) ST y de solución pH  $4,00 \pm$  (20°C) (coloreada de rojo) ST (Panreac Química S.L.U, Castellar del Vallès, Barcelona, España).

#### **3.2 Soluciones poliméricas**

En primer lugar se realizó una disolución al 20% p/p (peso/peso) de PMVEMA-Ac que se utilizó como blanco. En segundo lugar, se realizaron 3 disoluciones al 20% p/p de PMVEMA-Ac a diferentes concentraciones de glutation: 1% p/p, 5% p/p y 10% p/p. Se eligieron estas concentraciones crecientes de glutation con el fin de ver como de cargadas quedaban las fibras conforme se añadía más metabolito.

Para elaborarlas se pesó la cantidad correspondiente de PMVEMA-Ac y se añadió agua, se puso en agitación magnética de manera constante y suave durante aproximadamente una hora. Una vez pasado el tiempo se sonicó 10 minutos para evitar restos de burbujas. Por último, se añadieron las cantidades adecuadas de glutation y se volvió a agitar. Por tanto, quedaron las siguientes disoluciones:

- 1) PMVEMA-Ac 20% p/p
- 2) PMVEMA-Ac 20% p/p + GLU 1% p/p
- 3) PMVEMA-Ac 20% p/p + GLU 5% p/p
- 4) PMVEMA-Ac 20% p/p + GLU 10% p/p

Para elaborar las nanofibras de PMVEMA-Es se realizó una disolución al 25% p/p de PMVEMA-Es que se usó como blanco. El porcentaje al que se añadió fue seleccionado porque en estudios previos en el laboratorio se determinó que ese porcentaje era el adecuado para una buena elaboración de fibras con este polímero <sup>(21)</sup>. Después se fabricaron 3 disoluciones al 25% p/p de PMVEMA-Es a concentración de 1%, 5% y 10% de glutación, cómo con el polímero anterior, siendo los resultados diferentes. Las disoluciones de PMVEMA-Es 25% p/p al 5% y 10% p/p de glutación no pudieron seguir en el estudio ya que el glutación dejaba de ser soluble, por tanto, quedaron las siguientes soluciones:

- 1) PMVEMA-Es 25% p/p
- 2) PMVEMA-Es 25% p/p + GLU 1% p/p

Se repite el mismo proceso de agitación magnética y sonicación de las disoluciones con PMVEMA-Ac. Todas estas fueron preparadas y conservadas a una temperatura de  $20 \pm 5$  °C.

### 3.3 Viscosidad

La viscosidad es un parámetro que sirve para saber si una muestra es electrohilable o no. Se utiliza el viscosímetro capilar Vidra Foc de 500mL (Barcelona, España) para el caso de las disoluciones poliméricas de PMVEMA-Ac y el viscosímetro Vidra Foc de 350mL (Barcelona, España) para el caso de las disoluciones poliméricas de PMVEMA-Es. Se emplean diferentes viscosímetros ya que las disoluciones realizadas con PMVEMA-Es eran mucho menos viscosas, lo que causa que el tiempo medido que se usa en la fórmula de la viscosidad sea muy pequeño, por ello se cambia a un viscosímetro de menor volumen y se aplica una constante diferente que viene dada por el fabricante del viscosímetro.

Para calcular la viscosidad se necesita saber la densidad de la disolución, la constante del laboratorio fabricante y el tiempo medio que tarda en pasar el líquido entre las 2 marcas señaladas en el viscosímetro para aplicar la fórmula y obtener la viscosidad de la disolución en centipoise (cP).

Se realizaron 3 medidas por cada disolución, obteniéndose así el tiempo medio que es el que se utilizó en la fórmula.

$$\mu = k * \rho * t$$

- Siendo ( $\mu$ ) la viscosidad, ( $\rho$ ) la densidad y ( $t$ ) tiempo medio.

### 3.4 Electrohilado

Fue el método de elección para la elaboración de las nanofibras. El equipo está formado por:

- Una fuente de alto voltaje GlassMan High Voltage FC60P2 (Glassman High Voltage Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, Estados Unidos).
- Una bomba de inyección KDScientific-100-CE (KD Scientific, Holliston, MA, Estados Unidos).

Se usaron jeringuillas de 2 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) que se unen a una aguja acero inoxidable 316, calibre 1,2 mm y punta roma con un ángulo de 90° en alineación vertical (Sigma Aldrich). En estas jeringas se cargaron las disoluciones correspondientes a cada porcentaje.

Los parámetros de electrohilado utilizados (Tabla 1) para elaborar las nanofibras poliméricas fueron escogidos en base a resultados previos de otros trabajos realizados en el laboratorio <sup>(21)</sup>.

Tabla 1: Parámetros utilizados en la técnica del electrohilado

Distancia aguja-colector	Flujo	Voltaje
<b>PMVEMA-Ac</b>		



10 cm	0,25 ml/h	16kV
<b>PMVEMA-Es</b>		
17 cm	0,25 ml/h	18kV

kV: kilovoltios

### **3.5 Análisis morfológico de las nanofibras**

Para ello, se va a utilizar la microscopía óptica y electrónica para observar cómo de homogéneas son y sus posibles defectos visibles.

#### **3.5.1 Microscopía óptica**

Para observar la uniformidad de las fibras, primeramente se utilizó un microscopio óptico MycosystemsDMI3000B (Leica, Bensheim, Alemania) que tiene una cámara Leica DFC 3000G y una fuente de luz LEICA EL6000. Las imágenes obtenidas se analizan mediante el programa Leica Application Suite AF 6000 Module System.

#### **3.5.2 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo**

Para poder observar el diámetro, además de la uniformidad con mayor precisión, se empleó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FSEM) con un aparato Schottky de emisión de campo de cátodo caliente modelo SIGMA 300 VP (Orberkochen, Alemania).

Una vez se obtuvieron las imágenes, con el programa informático Image J se analizaron los diámetros de las nanofibras. Se realizaron 100 medidas por cada concentración de metabolito y con el *software* Graphpad Prism 8 se realizaron los histogramas y se observó la variabilidad de diámetros.

### **3.6 Determinación cualitativa: Espectroscopía infrarroja**

Para poder realizar la espectroscopía infrarroja se elaboraron pastillas con los polímeros PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es, el metabolito glutation y bromuro de potasio

(KBr) (Sigma Aldrich). Se usó un espectrofotómetro de infrarrojo Spectrum Two™ (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para la realización de esta prueba:

- En primer lugar, se obtuvieron los espectros de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% y PMVEMA-Es 25% que se usaron como blanco.
- Después se elaboró un espectro únicamente de glutation en polvo.
- Por último, un espectro de las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% con GLU 10% y otro de las nanofibras de PMVEMA-Es 25% con GLU 1%.

Para la realización de las pastillas en primer lugar se pulverizó en un mortero de Ágata con un pistilo el KBr y los diferentes componentes según el espectro que se quisiera obtener, quedando distintas pastillas preparadas para ser analizadas. Una vez está todo homogeneizado se pasa la mezcla a un molde de 13 mm (SPECAC, Cray Ave, Orpington, Reino Unido). Después con la ayuda de una prensa hidráulica manual (SPECAC) se comprime durante unos minutos de forma constante. Una vez tenemos las pastillas, éstas se meten en el espectrofotómetro de infrarrojo una por una, obteniéndose los espectros correspondientes que determinan cualitativamente si hay o no metabolito en las muestras.

### **3.7 Determinación cuantitativa: Cromatografía líquida de alta resolución**

Para determinar la cantidad de metabolito en la nanofibra se utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es una técnica cuantitativa.

Se utilizó un equipo Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Kioto, Japón), formado por un horno termostaticado, un inyector automático, una unidad desgasificadora, dos bombas unitarias y un detector ultravioleta a una longitud de onda de 215 nm con un espectrofotómetro de masas triple cuadrupolo equipado con una interfase de ionización de electrospray. El software utilizado para procesar los datos fue *LabSolutions* de Shimadzu y se empleó la columna reversa LiCrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm x 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Se aplicó como base del método lo descrito por Vijaykumar y colaboradores <sup>(30)</sup>, modificándolo acorde a los materiales de los que se disponía. El método empleado fue isocrático, compuesto por una fase móvil de agua y acetonitrilo 50:50 volumen/volumen (v/v). El flujo fue de 1ml/min, la duración de análisis de 5 minutos. y el volumen de inyección de 20 microlitros. Este proceso se completó con un análisis de espectrometría de masas para ser más precisos.

La cantidad pesada de nanofibra fue de 29 mg para la nanofibra de PMVEMA-Ac GLU 1%, 11 mg para la de GLU 5% y 13 mg para la de GLU 10%.

- En la de GLU 1%, la concentración teórica de glutation es de 0,29 mg/ml.
- En la de GLU 5%, la concentración teórica de glutation es de 0,55 mg/ml.
- En la de GLU 10%, se realizó una dilución para evitar que se saturara, de manera que se obtuvo una concentración de 0,5 mg/ml de glutation.

### 3.7.2 Recta de Calibrado

En la elaboración de la recta de calibrado o recta patrón, utilizada para conocer cuantitativamente la cantidad de glutation en la nanofibra, se disolvió el metabolito en polvo en agua a diferentes concentraciones obteniendo 6 puntos (Tabla 2). Se realizó una dilución 1/160 de cada concentración para poder elaborar la recta.

*Tabla 2: Concentraciones de la recta de calibrado para HPLC*

Puntos Recta	Concentración (mg/ml)	Concentración 1/160 (mg/ml)
Punto 1	0,20	0,00125
Punto 2	0,30	0,00187
Punto 3	0,50	0,00312
Punto 4	0,65	0,00406
Punto 5	0,80	0,00500
Punto 6	1,00	0,00625

La correlación lineal entre las concentraciones y las áreas obtenidas de cada punto, permite la obtención de la recta de calibrado, para posteriormente analizar la carga de glutation en las fibras elaboradas en los viales de análisis.

### **3.8 Ensayo *in vitro*: tiempo de descomposición de la nanofibra**

Para la elaboración de esta prueba se empleó una placa con 24 pocillos. En cada pocillo se añadieron 5 mg de las diferentes nanofibras cargadas y del blanco y 2 ml del pH correspondiente. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- Para las nanofibras del blanco que solo contenía PMVEMA-Ac, se usaron 3 pocillos. En el primero se pusieron 2 ml de un tampón de solución pH 4, en el segundo uno de solución pH 7 y en el tercero uno de solución pH 10. En cada pocillo se pusieron 5 mg de nanofibra, con lo que en total se necesitaron 15 mg de fibra de PMVEMA-Ac blanco.
- Para las nanofibras de PMVEMA-Ac GLU 1%, 5% y 10% se siguió el mismo procedimiento que antes pero por duplicado, es decir, se repitió el proceso por segunda vez. Por ello se necesitaron 6 pocillos y 30 mg de fibra por cada porcentaje.

Se documentó con fotografías al instante, a la hora y a las tres horas para que se observara como de disuelta se encontraba la nanofibra en el medio. Además, se extrajo una alícuota de 20  $\mu$ l de cada pocillo de fibra a cada pH; en esos mismos tiempos para cuantificar por HPLC cuánto glutation se había liberado, siendo en total 36 alícuotas. Para la cuantificación se elaboró una recta de calibrado usando las mismas 6 concentraciones descritas anteriormente en el apartado de HPLC, salvo que aquí no se realizó una dilución 1/160.

Al pesarse 5 mg de fibra en 2 ml de pH, la concentración teórica de GLU en la nanofibra es de 0,05 mg/ml para de GLU 1%, 0,125 mg/ml para GLU 5% y 0,25 mg/ml para GLU 10%. Tanto la concentración de GLU 1% como la de GLU 5% se encuentran fuera de la recta de calibrado. Aún así, se cuantificaron las muestras de glutation al 5% y 10%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de la viscosidad

Antes de la elaboración de las fibras mediante electrohilado, se comprobó la viscosidad de las disoluciones poliméricas. La viscosidad es de gran importancia ya que, cuanto menor sea la viscosidad menor será el diámetro de la fibra, que es lo que se quiere obtener, ya que a mayor cantidad de superficie mayor posibilidad de liberación de principio activo <sup>(13)</sup>. Los resultados de las viscosidades se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de la prueba de viscosidad

Disolución	Viscosidad (centipoise (cP))
<b>PMVEMA-AC</b>	
PMVEMA-Ac 20%	1489 ± 37
PMVEMA-Ac 20% y GLU 1%	1895 ± 24
PMVEMA-Ac 20% y GLU 5%	2065 ± 45
PMVEMA-Ac 20% y GLU 10%	2307 ± 8
<b>PMVEMA-ES</b>	
PMVEMA-Es 25%	171 ± 2
PMVEMA-Es 25% y GLU 1%	120 ± 0

En el caso del PMVEMA-Ac, la viscosidad aumenta conforme aumenta la concentración de metabolito. Además, la disolución utilizada como blanco presenta la menor viscosidad ya que no contiene glutation. No varían entre sí en exceso y las

disoluciones al 5% y al 10% de GLU sobrepasan ligeramente el intervalo idóneo de viscosidades para la elaboración de nanofibras ya que es de 100 a 2000 cP <sup>(31)</sup>. Al no sobrepasar en gran medida el intervalo idóneo, se prevé que son electrohilables.

En el caso de las disoluciones con PMVEMA-Es, ambas se encuentran en el rango idóneo, pero la viscosidad disminuye cuando se introduce el metabolito y lo lógico, lo que cabía esperar, era que al cargarse de metabolito la viscosidad aumentara. Aún así no hay mucha diferencia entre las dos disoluciones y la carga de metabolito es mínima. En algunas ocasiones, pequeñas concentraciones de un compuesto pueden modificar la viscosidad de la disolución a la baja, haciéndola más fluida <sup>(32)</sup>. Ello puede ser debido a que el principio activo puede ser capaz de disgregar las uniones posibles entre polímero-fármaco-disolvente y polímero-polímero.

## **4.2 Morfología de las nanofibras**

Mediante microscopía óptica y electrónica se pudo observar la morfología y analizar el grosor de la fibra mediante la obtención de sus diámetros. La microscopía óptica se realizó en primer lugar, pero es la electrónica la que verdaderamente permite ver con mayor precisión y exactitud si la fibra presenta algún tipo de desperfecto como los beads, que son perlas que aparecen en las nanofibras, y el electro spray que es la formación de gotas <sup>(33)</sup>. Con los diámetros obtenidos se realizó un histograma, ajustado a una curva gaussiana, en el que se ven los distintos diámetros de las fibras.

### **4.2.1 Nanofibras de PMVEMA-Ac**

Para las nanofibras de PMVEMA-Ac 20%, la media de los diámetros fue de  $299 \pm 40$  nm. Se elaboró un histograma (Figura 5A) en el cual se observó cierta variabilidad ya que se obtienen diámetros que abarcan desde los 200 a 400 nm. La mayor frecuencia de diámetros se encuentra en torno a los 250 y 350 nm. Para observar la homogeneidad de las nanofibras se observaron por microscopía óptica (Figura 5B) y electrónica (Figura 5C), concluyendo que al no observarse beads, ni electro spray, éstas presentan un aspecto homogéneo.

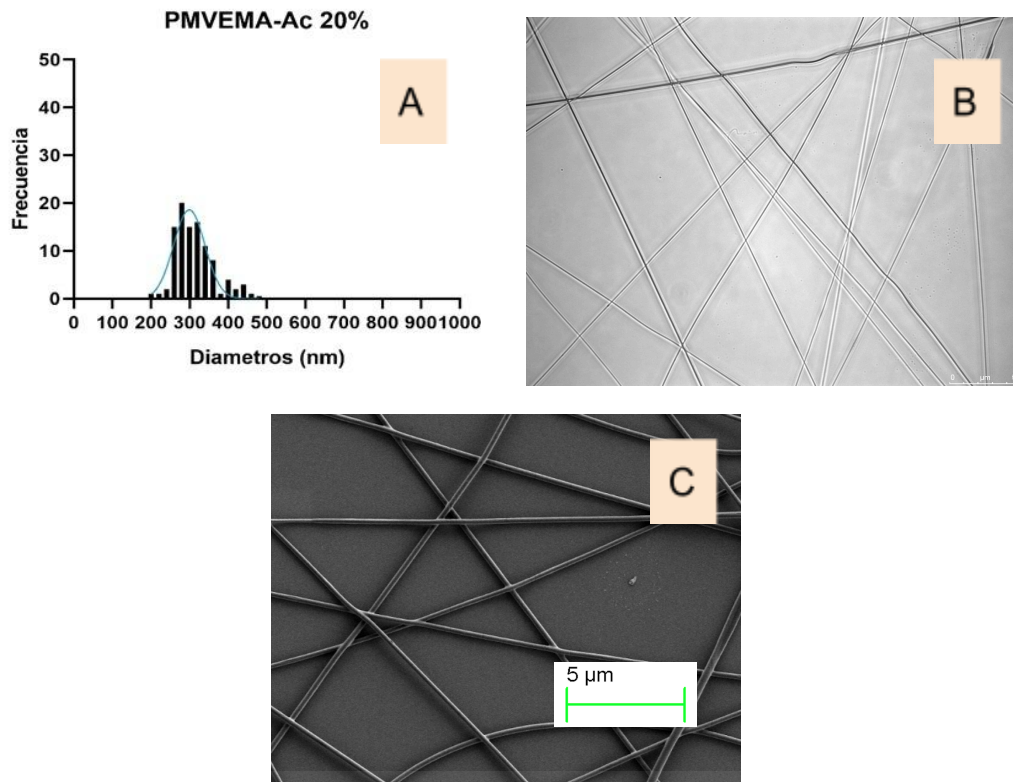
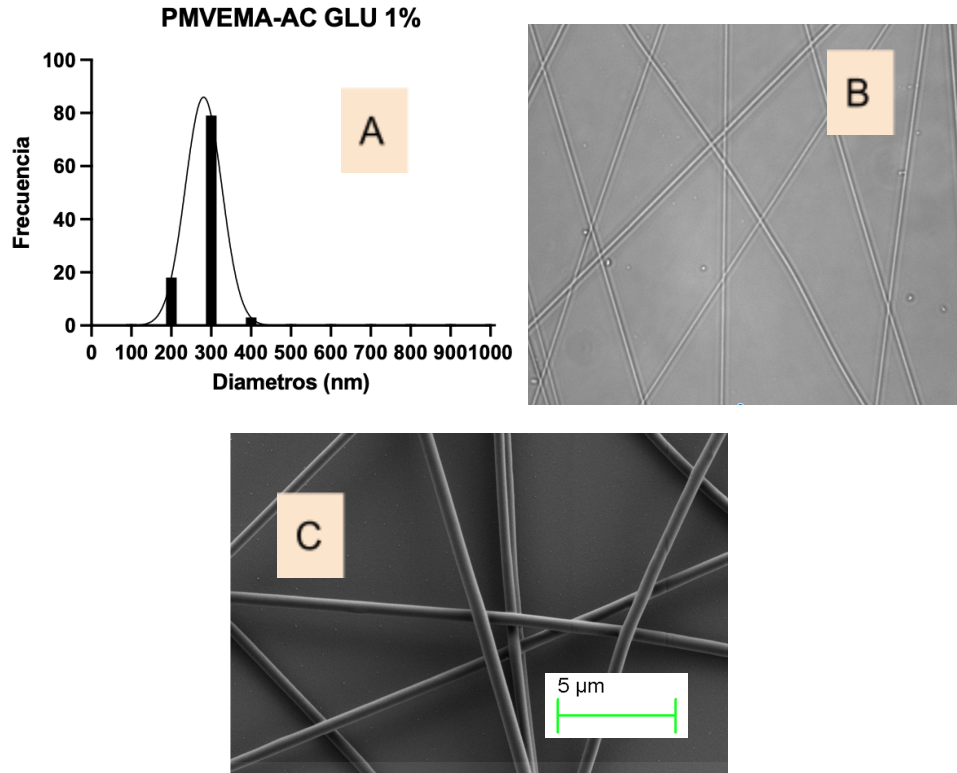


Figura 5: (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20%. (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20% obtenida por microscopía óptica 40x. (C) Imagen de PMVEMA-Ac 20% obtenida por microscopía electrónica.

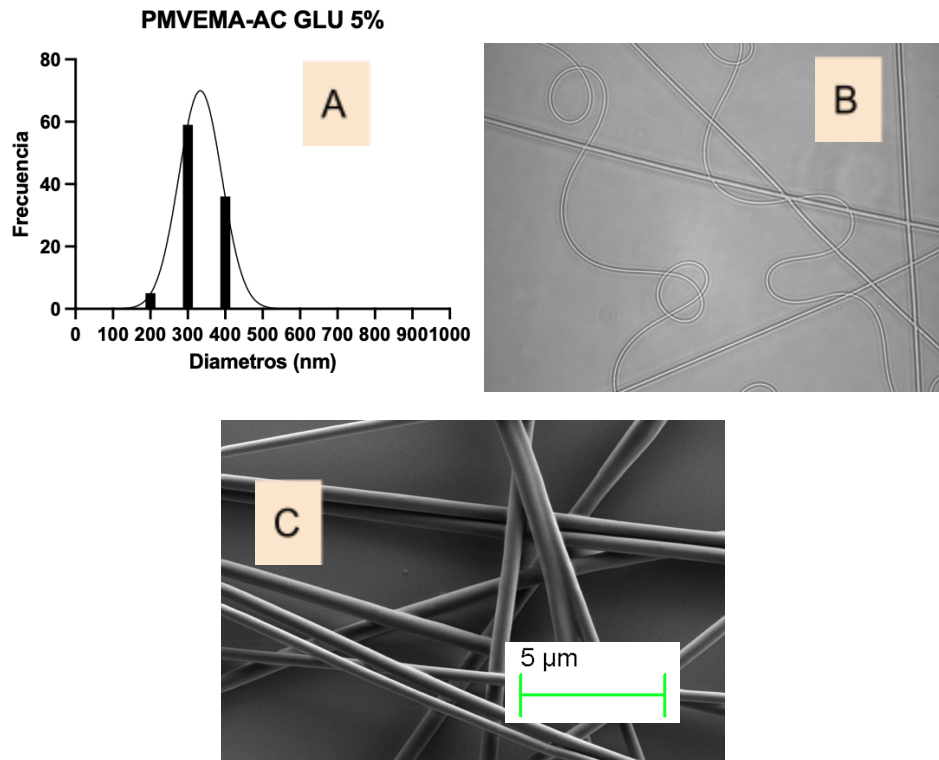
Para las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% + GLU 1%, la media de los diámetros fueron de  $277 \pm 29$  nm. Se elaboró un histograma (Figura 6A) para poder observar qué diámetros habían sido más frecuentes. La mayoría de estos se encuentran alrededor de los 300 nm, a pesar de que se aprecian 2 subpoblaciones a los 200 y 400 nm. En general, el resultado fue equilibrado y no se aprecian dos poblaciones de diámetros muy dispares. Por otro lado, con la microscopía óptica (Figura 6B) y electrónica (Figura 6C) se pudo apreciar que el aspecto era homogéneo, no se encontraron beads, ni electrospay.



*Figura 6: (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% y GLU 1%. (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20% y GLU 1% obtenida por microscopía óptica 40x. (C) Imagen de PMVEMA-Ac 20% y GLU 1% obtenida por microscopía electrónica.*

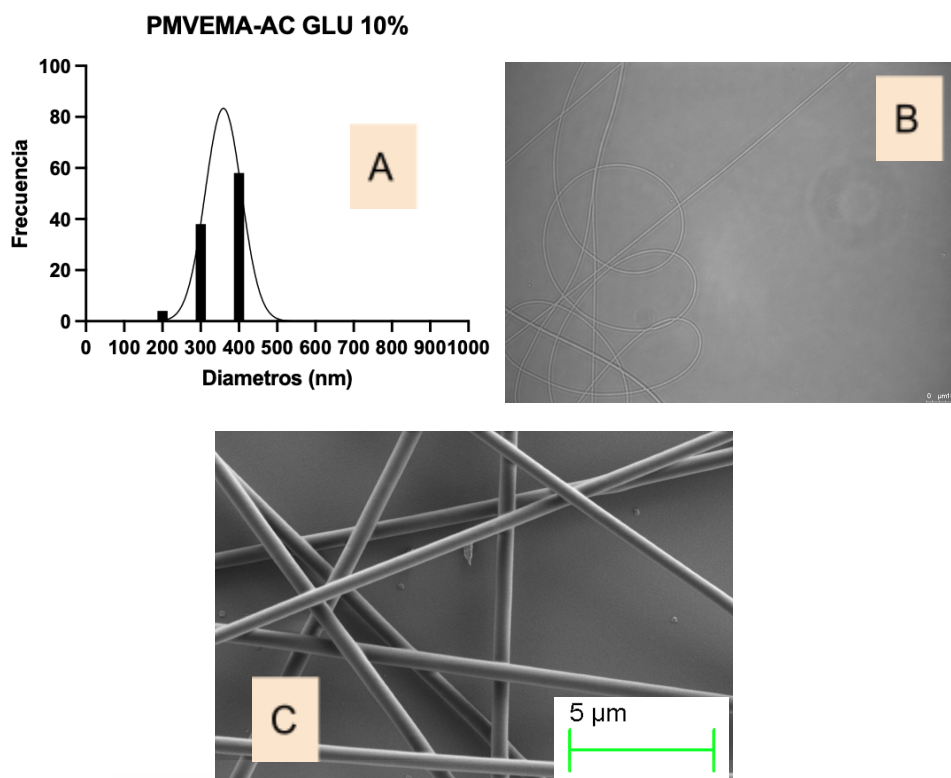
En cuanto a las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% + GLU 5%, se obtuvo un diámetro medio de  $331 \pm 54$  nm. Tamaño mayor al de las fibras anteriores ya que en estas se puso más cantidad de principio activo y, por tanto, era lo que cabía esperar. Se realizó un histograma (Figura 7A) en el que se observa que la mayor frecuencia de diámetros se encuentra en torno a los 300 nm, aunque en comparación con las fibras de GLU al 1%, aquí hay una subpoblación bastante marcada en torno a los 400 nm pero subpoblación a los 200 nm es menos pronunciada. Para observar la homogeneidad de las nanofibras se observaron por microscopía óptica (Figura 7B) y electrónica (Figura 7C), concluyendo que al no observarse defectos en ellas, eran homogéneas.





*Figura 7: (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% y GLU 5%. (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20% y GLU 5% obtenida por microscopía óptica 40x. (C) Imagen de PMVEMA-Ac 20% y GLU 5% obtenida por microscopía electrónica.*

Se midieron las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% + GLU 10% obteniéndose un diámetro medio de  $348 \pm 40$  nm. Se obtuvo un histograma (Figura 8A), con el que se pudo observar que estas poseen un diámetro medio mayor que en los 2 casos anteriores (GLU al 1% y 5%), ya que al llevar más cantidad de principio activo las fibras son más gruesas. Aquí hay cierta variabilidad en cuanto a los diámetros, no son tan homogéneos entre sí como ocurría en las fibras de GLU 1%, ya que a pesar de que los diámetros en torno a los 400 nm son los más frecuentes, se encuentra una subpoblación marcada a los 300 nm. También hay una a los 200 nm pero es menos pronunciada. El aspecto de las nanofibras fue homogéneo (Figura 8B y 8C).



*Figura 8: (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% y GLU 10%. (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20% y GLU 10% obtenida por microscopía óptica 40x. (C) Imagen de PMVEMA-Ac 20% y GLU 10% obtenida por microscopía electrónica.*

#### 4.2.2 Nanofibras de PMVEMA-Es

Se midieron las nanofibras de PMVEMA-Es 25% obteniéndose un diámetro medio de  $720 \pm 298$  nm, el mayor obtenido hasta el momento. Se obtuvo un histograma (Figura 9A), en el que se puede apreciar que hay bastante variabilidad en cuanto a los diámetros de las nanofibras. Los diámetros más frecuentes se encuentran en torno a los 600 nm pero hay subpoblaciones a lo largo del histograma y son bastante significativas además de dispares entre sí, ya que hay tanto a los 400 nm como a los 1200 nm. Por tanto, hay fibras mucho más gruesas que otras lo que causa este resultado tan heterogéneo en los resultados.

En cuanto al aspecto de las fibras, no se han formado beads ni electrospray pero claramente la morfología es heterogénea ya que parece que se han fusionado las fibras entre sí, formando fibras dobles o solapadas. Esto causa que a la hora de

medir los diámetros de las fibras, este sea mucho mayor a las de PMVEMA-Ac y que haya mayor variabilidad entre diámetros. (Figura 9B y 9C)

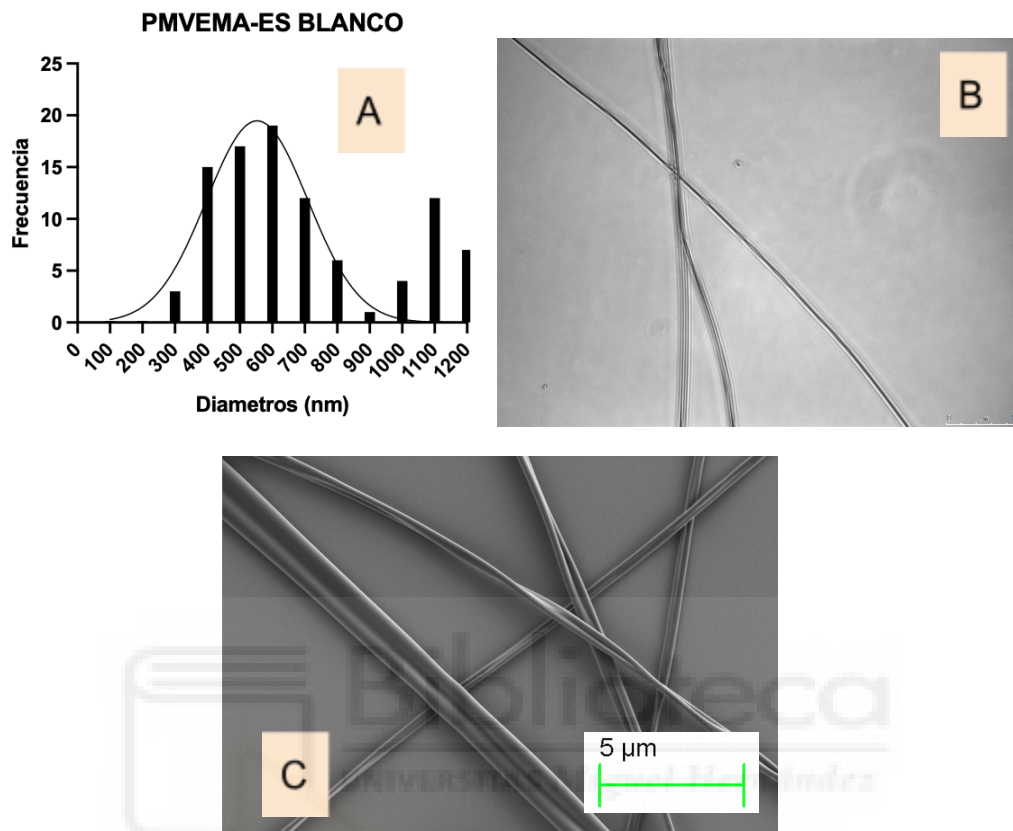


Figura 9: (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Es 25%. (B) Imagen de PMVEMA-Es 25% obtenida por microscopía óptica 40x. (C) Imagen de PMVEMA-Es 25% obtenida por microscopía electrónica.

En último lugar, se midieron los diámetros de las nanofibras de PMVEMA-Es 25% y GLU 1%. El diámetro medio obtenido fue de  $667 \pm 169$  nm, el cual es mucho mayor al de las nanofibras realizadas con PMVEMA-Ac. Se realizó un histograma (Figura 10A) en el que se puede ver que vuelve a haber variabilidad en los diámetros. Los más frecuentes se encuentran en torno a los 600 nm, pero hay subpoblaciones notables a los 500, 700 y 800 nm. Es heterogéneo (Figura 10B y 10C) a pesar de que no se encuentran beads ni electrospay, ocurre lo mismo, que las nanofibras se han fusionado entre sí, lo que causa ese aumento en el tamaño.

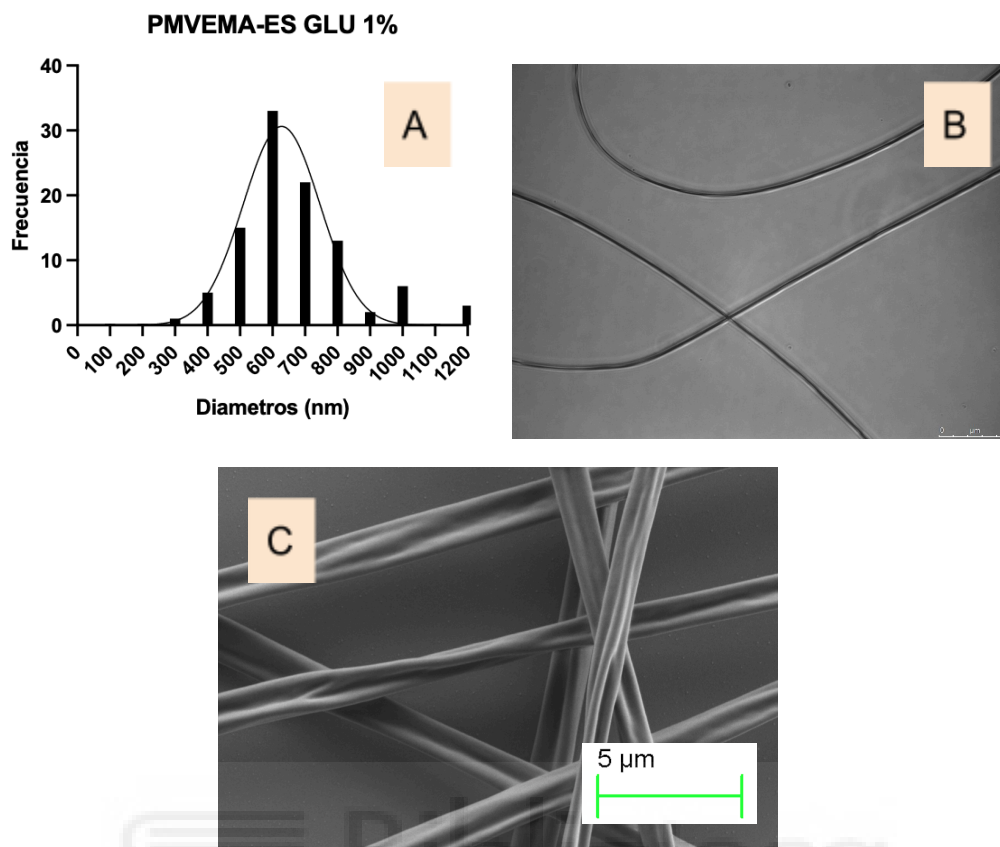


Figura 10: (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Es 25% y GLU 1%. (B) Imagen de PMVEMA-Es 25% y GLU 1% obtenida por microscopía óptica 40x. (C) Imagen de PMVEMA-Es 25% y GLU 1% obtenida por microscopía electrónica.

En el caso de las nanofibras elaboradas con PMVEMA-Es, se decidió no llevar a cabo la evaluación cuantitativa por HPLC y el ensayo *in vitro* del tiempo de liberación ya que los diámetros fueron demasiado dispares y el aspecto de las nanofibras fue muy heterogéneo, obteniéndose fibras mucho más gruesas que otras estando éstas fusionadas entre sí. Además, la diferencia de diámetros entre las fibras blanco PMVEMA-Es 25% con las fibras de PMVEMA-Es 25% con GLU 10% era demasiado grande.

### 4.3 Evaluación cualitativa de las nanofibras

La evaluación cualitativa de las fibras se consigue con espectroscopía infrarroja. Esta consiste en la absorción de radiación infrarroja por parte de las moléculas en

estado de vibración <sup>(34)</sup>. Se ha realizado la prueba de espectroscopía en las nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac 20% y PMVEMA-Es 25% con glutatión al 10% y 1% respectivamente.

En primer lugar, se realizó la prueba con las nanofibras de PMVEMA-Ac. El espectro (Figura 11) obtenido combina 3 espectros diferentes: el de PMVEMA-Ac 20% en forma de nanofibra, el GLU como polvo y el PMVEMA-Ac 20% con GLU al 10% en forma de nanofibra.

- En cuanto al PMVEMA-Ac 20% (color verde), se observa una banda en torno a los 1100 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración de tensión C-O del grupo éter <sup>(35)</sup>. Respecto al grupo del ácido carboxílico vemos que se extiende a lo largo del espectro, se observa una banda a los 1200 cm<sup>-1</sup> que evidencia la tensión C-O <sup>(35)</sup>. Después, la tensión C=O se ve reflejada en una banda a los 1700 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup> y por la tensión O-H se extiende desde los 2600 a los 3500 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>.
- Con respecto al espectro del glutatión (color amarillo), el grupo carboxílico se ve reflejado con la tensión C-O a los 1300 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>, con la tensión C=O a los 1700 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>, por la tensión O-H extendida sobre la banda entre 3400 y 2700 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup> y por la deformación O-H a los 1440 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>. Para el azufre, se observa una banda a los 2550 que corresponde a la tensión S-H <sup>(35)</sup>. En cuanto a la amida, la tensión C=O se observa en la banda de 1680 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>, la tensión N-H a los 3180 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup> y la deformación N-H alrededor de los 1550 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>. Finalmente, la amina se ve reflejada por la tensión C-N a los 1025 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>, por la tensión N-H a los 3400 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup> y la deformación N-H a los 1600 cm<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>.
- Por último el espectro correspondiente a las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% y GLU 10% (color rosa) es bastante parecido al espectro de las nanofibras de PMVEMA-Ac. Aún así, la banda del espectro de PMVEMA-Ac 20% y GLU 10%, comprendida entre los 2100 y los 1750 cm<sup>-1</sup>, es bastante parecida a la banda de GLU 10%, a pesar de no haber grupos funcionales relevantes en esa zona. Hay cierta semejanza en los picos pertenecientes al grupo carboxílico del espectro del PMVEMA-Ac 20% con GLU 10% y el espectro de GLU al 10%, de hecho la banda perteneciente a la tensión O-H comprende prácticamente la misma longitud. Esto nos hace pensar que, en efecto, el

metabolito se encuentra en la nanofibra. Se verificará más adelante con la prueba de cromatografía de capa líquida (HPLC).

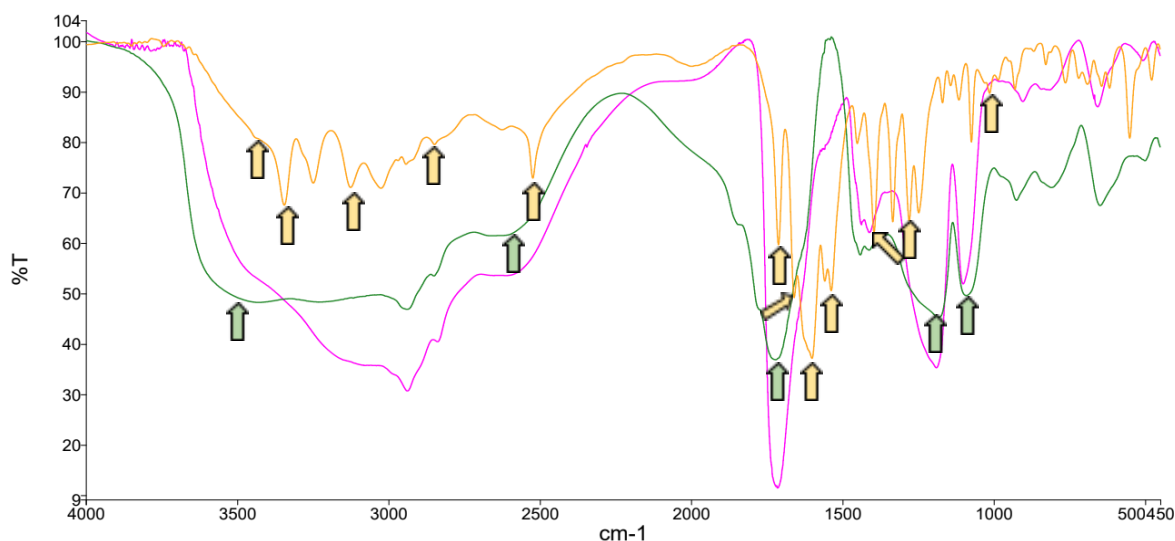


Figura 11: Espectro de infrarrojo de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% en color verde, espectro de GLU en color amarillo y el de las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% y GLU 10% en color rosa.

Por otra parte, se obtuvo otro espectro (Figura 12) que combina: el espectro del PMVEMA-Es 25% en forma de nanofibra, el de GLU como polvo y el de PMVEMA-Es 25% con GLU al 1% en forma de nanofibra.

- En cuanto al espectro PMVEMA-Es 25% (color amarillo), el grupo éster se ve reflejado en una banda en torno a los 1740  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión  $\text{C}=\text{O}$  <sup>(35)</sup> y en otra en torno a los 1230  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión  $\text{C}-\text{C}(\text{O})-\text{C}$  <sup>(35)</sup>. En cuanto al grupo del ácido carboxílico, se observa la tensión  $\text{O}-\text{H}$  entre los 3500 y 2600  $\text{cm}^{-1}$  <sup>(35)</sup>, la tensión  $\text{C}-\text{O}$  en torno a los 1320  $\text{cm}^{-1}$  <sup>(35)</sup> y la tensión  $\text{C}=\text{O}$  a los 1730  $\text{cm}^{-1}$  <sup>(35)</sup> que se superpone con la tensión  $\text{C}=\text{O}$  del grupo del ácido carboxílico. También se observa una banda en torno a los 1100  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión  $\text{C}-\text{O}$  del grupo éter <sup>(35)</sup>
- El espectro del GLU 10% (color rojo) es igual al comentado con anterioridad en el espectro de IR con el PMVEMA-Ac 20%.

- Por último el espectro correspondiente a las nanofibras de PMVEMA-Es 25% y GLU 10% (color azul) es bastante parecido al espectro de las nanofibras de PMVEMA-Es 25% solo. Aún así, los picos pertenecientes al grupo carboxílico del espectro del GLU 10% solo, se ven destacados en el espectro del PMVEMA-Es 25% con GLU al 10%. Para poder confirmar se debería realizar una cuantificación por HPLC, pero debido a los resultados obtenidos en la microscopía óptica y electrónica se decidió continuar con el HPLC para las nanofibras de PMVEMA-Ac únicamente.

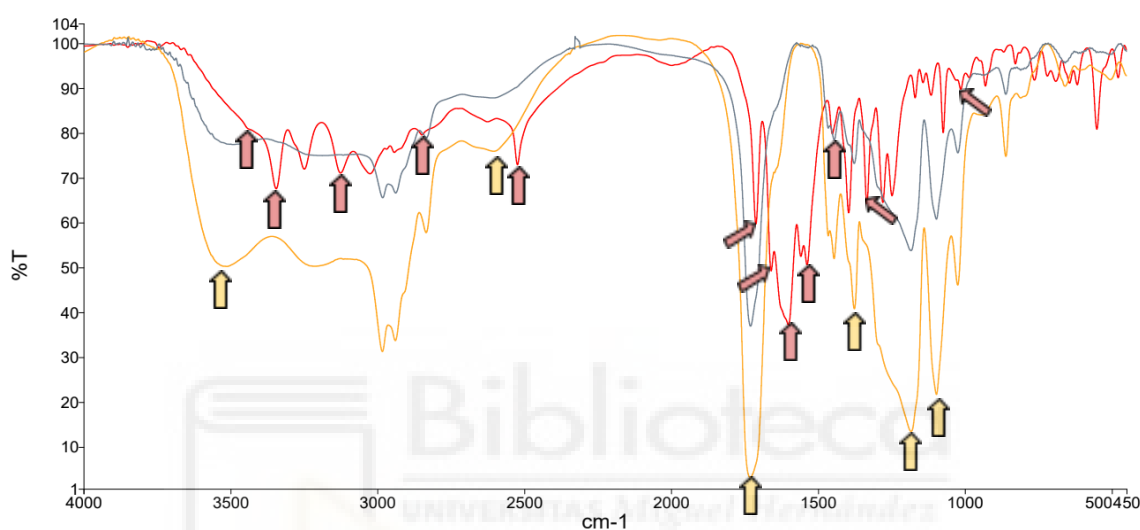


Figura 12: Espectro de infrarrojo de nanofibras de PMVEMA-Es 25% en color amarillo, espectro de GLU en color rojo y el de las nanofibras de PMVEMA-Es 25% y GLU 1% en color azul.

#### 4.4 Evaluación cuantitativa de las nanofibras

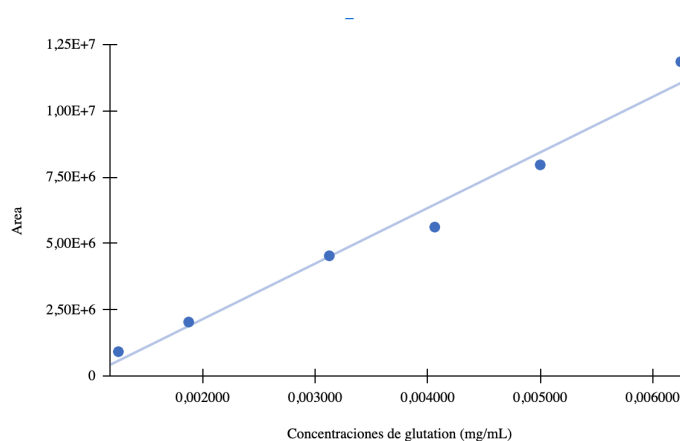
Solo se realizó en las nanofibras elaboradas con PMVEMA-Ac 20% por los motivos comentados. En primer lugar, se obtuvo la recta de calibrado (figura 13) usando las concentraciones descritas anteriormente de los 6 puntos con sus áreas correspondientes. Tras representar la recta, se obtuvo la ecuación y la  $R^2$  que fueron  $y = 2E+09 \cdot x$  y 0,979 respectivamente. La  $R^2$  debería ser de 0,99<sup>(36)</sup>, lo cual no se corresponde al resultado obtenido. Esto puede ser debido a errores realizados durante el pipeteo de las disoluciones o que, debido a la alta sensibilidad del equipo con el que se realizó, el HPLC asociado a masas/masas, o incluso a los diversos problemas que hubo con las paradas del equipo y, por tanto, quedarse varios días

las muestras en el interior del mismo sugiriendo una posible degradación de las muestras de nanofibras con glutation y la propia muestras de la recta de calibrado. También, puede ser debido a que las disoluciones preparadas para electrohilar no se guardaron en nevera. Esto es así porque se pensó que, al ser poco el tiempo que iban a estar fuera, no se degradaría el glutation que contenían.

Con la recta de calibrado se pudieron sacar las concentraciones reales (tabla 4) en las fibras de GLU 1%, 5% y 10% ya que, al tener sus áreas, se sustituyó en la ecuación obtenida obteniendo el resultado. Las concentraciones que se sacaron fueron multiplicadas por 160 debido a la dilución realizada anteriormente. Estas fueron comparadas con las concentraciones teóricas que se añadieron al vial al principio. Con una regla de tres, se obtienen los porcentajes de glutation recuperados de cada fibra.

*Tabla 4: Tabla con las concentraciones teóricas, reales y el porcentaje de glutation recuperado.*

Vial análisis	Concentración teórica (mg/ml)	Concentración real (mg/ml)	Concentración real multiplicada por 160 (mg/ml)	Porcentaje de GLU encapsulado (%)
GLU 1%	0,29	0,00095404	0,15264664	52
GLU 5%	0,55	0,00206618	0,33058888	60
GLU 10%	0,50	0,00282026	0,45124184	90



*Figura 13: Recta de calibrado del glutation para HPLC*



Con este ensayo, se puede ver que efectivamente hay glutation encapsulado en las nanofibras. El porcentaje de glutation encapsulado fue de: 52%, 60% y 90% para las nanofibras de GLU 1%, 5% y 10% respectivamente. Aumenta considerablemente a medida que aumenta la cantidad de glutation añadida ya que es casi un 40% mayor en el caso de las elaboradas con GLU al 10% que en las de GLU al 1%.

#### 4.5 Estudio *in vitro* de tiempo de degradación de la nanofibra

Las nanofibras depositadas sobre los pocillos se disolvieron visualmente al instante (ilustración 14). Tanto el PMVEMA-Ac<sup>(21)</sup> como el glutation<sup>(31)</sup> son solubles en agua, esto explica la rápida disolución en el tampón de solución pH 4, 7 y 10 ya que el elemento principal en su composición era el agua. Solo se pueden apreciar algún fragmento de fibra en algunos pocillos como el de GLU 5% a pH 7.

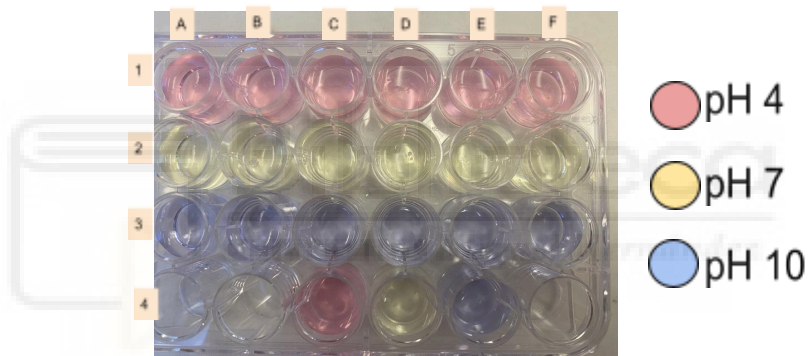


Figura 14: Nanofibra de PMVEMA-Ac y GLU en las 3 primeras filas. En la última fila nanofibras del blanco de PMVEMA-Ac solo. (Al instante)

Aún así, se documentó mediante fotografías cómo habían quedado las fibras en los pocillos a la hora (ilustración 15) y a las tres horas (ilustración 16), viendo que están prácticamente iguales entre sí.

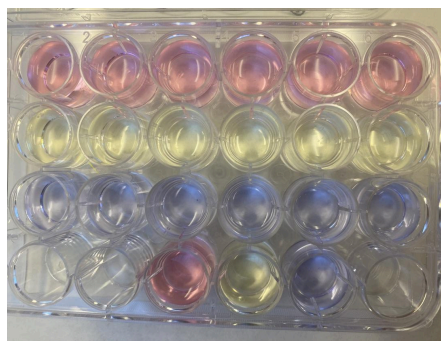


Figura 15: Nanofibras a la hora

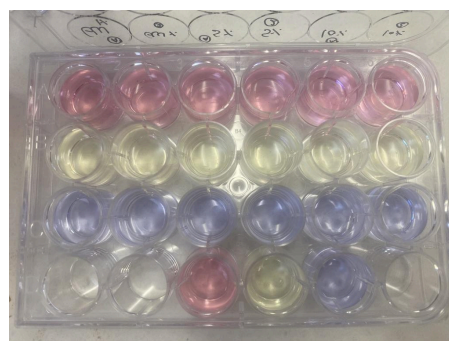


Figura 16: Nanofibras a las 3 horas

En cuanto a la cuantificación del glutatión liberado a los diferentes tiempos, la recta de calibrado (figura 17), su fórmula y R2 fueron de  $y=4E+08x$  y 0,997 respectivamente. Se substituyó las áreas correspondientes dando como resultado la concentración real que permite obtener el porcentaje de glutatión liberado.

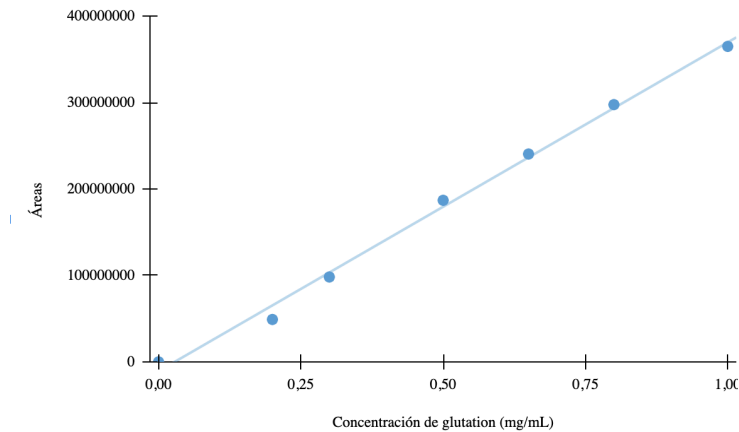
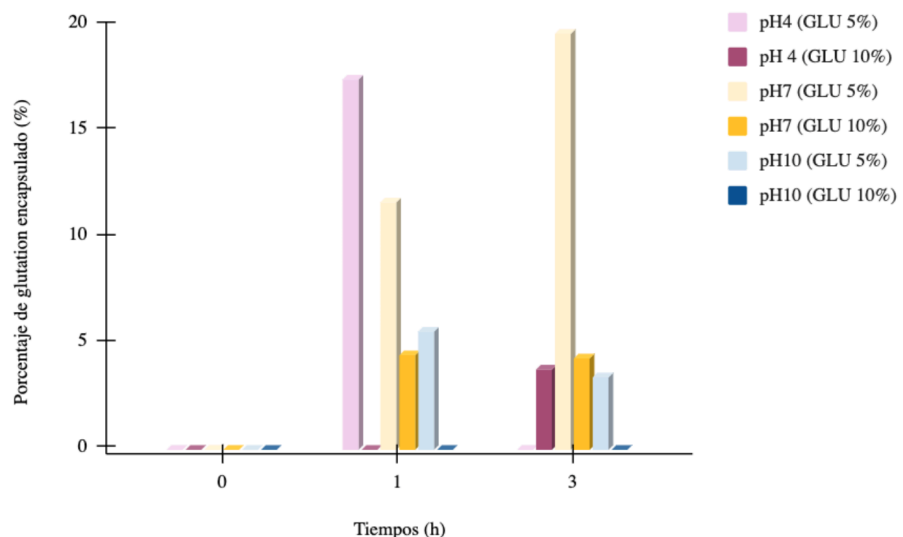


Figura 17: Recta de calibrado del glutatión para pH

Con las concentraciones teóricas y reales se obtuvo el porcentaje de glutatión liberado al instante, a la hora y a las tres horas (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentajes de liberación de glutatión reducido en función de los tiempos medidos en distintas soluciones de pH.

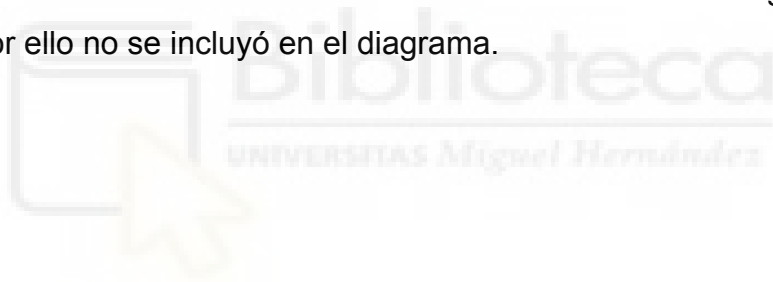


En cuanto al GLU 10%, a pesar de que a simple vista parecía que se las nanofibras se habían disuelto, y por tanto, el glutatión se había liberado, al cuantificar se ve que

el porcentaje liberado es muy pequeño. Para próximos ensayos se debería tomar una alícuota a las 8 horas, 12 horas y 24 horas. A tiempo 0 no se ha liberado glutatión en ninguno de los pH, mientras que a la hora, se ve que se ha liberado un 4,47% a pH 7. Finalmente a las 3 horas, se liberó un 3,8% a pH 4 y un 1,22% más a pH 7. El pH 10, es el único en el que no se libera glutatión a ninguno de los tiempos. Es posible que al estar teóricamente más cargado tarde más en liberar el metabolito, cosa que se podrá determinar en futuros ensayos.

En cuanto al GLU 5%, al igual que con GLU al 10%, a tiempo 0 tampoco se ha liberado glutatión. A la hora se ha liberado un 17,45% en pH 4, un 11,71% en pH 7 y un 5,62% en pH 10. Finalmente, a las 3 horas se libera un 19,69% más a pH 7 y un 3,48% a pH 10. Para próximos ensayos también se debería tomar una alícuota a las 8 horas, 12 horas y 24 horas.

Con respecto al blanco no se observó liberación de metabolito a ningún pH que era lo esperado; por ello no se incluyó en el diagrama.



## 5. CONCLUSIONES

La elaboración de nanofibras de PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es con glutation fue posible pero según los diferentes ensayos realizados, hay varias conclusiones:

- La viscosidad calculada para las nanofibras de PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es indica que todas se encuentran en el intervalo idóneo de viscosidades óptimas para el electrohilado.
- Mediante la espectroscopía óptica y electrónica se observó que las nanofibras elaboradas con PMVEMA-Ac tenían un aspecto homogéneo y su diámetro medio era de  $318 \pm 30$  nm, mientras que las elaboradas con PMVEMA-Es fueron muy heterogéneas y su diámetro medio era de  $667 \pm 169$ , el cual es prácticamente el doble al de las elaboradas con PMVEMA-Ac.
- Por espectroscopía infrarroja se evaluó cualitativamente si había glutation encapsulado. Se llegó a la conclusión que como el espectro de las nanofibras poliméricas con glutation y el espectro del glutation se solapan en algunos picos, indicaría la presencia de glutation encapsulado, siendo necesario corroborarlo mediante HPLC.
- Mediante HPLC, se confirmó de manera cuantitativa que, en efecto, había glutation encapsulado en las nanofibras con PMVEMA-Ac. Se encapsuló un 52%, 60% y 90% de glutation para las nanofibras de GLU 1%, 5% y 10% respectivamente.
- El estudio *in vitro* de tiempo de liberación se observó, de manera cualitativa que las nanofibras se degradaron prácticamente al instante de ponerlas en contacto con el tampón de solución pH. Sin embargo, al cuantificar por HPLC se comprobó que la cantidad de glutation liberada era baja, por lo que se tendría que haber tomado una alícuota a las 8, 12 y 24 horas. Se liberó más glutation al 5% que al 10%, ya que al estar más cargada es posible que le cueste más liberarlo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Macintyre, P., Rowbotham, D., & Walker, S. (2008b). *Clinical Pain Management Second Edition: Acute pain*. CRC Press.
2. *Farmacocinética: absorción y distribución*. (s. f.-b). Medwave. <https://www.medwave.cl/puestadia/cursos/3449.html>
3. SalusPlay. (2021, 29 julio). *Vías parenterales de administración de fármacos - El blog de Salusplay*. El Blog de Salusplay. <https://www.salusplay.com/blog/vias-parenterales-administracion-farmacos/#:~:text=V%C3%ADa%20Intravenosa,-Consiste%20en%20la&text=Entre%20sus%20inconvenientes%20destacan%20la,cuidados%20especiales%20y%20personal%20especializado>.
4. Le, J. (2022, 12 septiembre). *Administración de los fármacos*. Manual MSD Versión Para Público General. <https://www.msmanuals.com/es-es/hogar/f%C3%A1rmacos-o-sustancias/administraci%C3%B3n-y-cin%C3%A9tica-de-los-f%C3%A1rmacos/administraci%C3%B3n-de-los-f%C3%A1rmacos>
5. *Qué es Transdérmico. Diccionario Médico. Clínica U. Navarra*. (s. f.). <https://www.cun.es>. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/transdermico>
6. Tanner, T., & Marks, R. A. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Research And Technology*, 14(3), 249-260. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2008.00316.x>
7. Kamble, P., Sadarani, B., Majumdar, A., & Bhullar, S. K. (2017). Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 41, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.003>
8. Rahmani, M., Bidgoli, S. A., & Rezayat, S. M. (2017). Electrospun polymeric nanofibers for transdermal drug delivery. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doi.org/10.22038/nmj.2017.8407>
9. Subbiah, T., Bhat, G., Tock, R. W., Parameswaran, S., & Ramkumar, S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal Of Applied Polymer Science*, 96(2), 557-569. <https://doi.org/10.1002/app.21481>
10. Mallavia, R., Del Pilar, G. M. M., & Falcó, A. (2023, 1 junio). *Síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas como sistema de liberación de antineoplásicos en un modelo in vitro de glioblastoma*. <https://hdl.handle.net/11000/29371>
11. Rodríguez-Mirasol, J., Cordero-Alcántara, T., & Química, I. (2012). *Preparación de nanofibras de carbono y cerámica para aplicaciones en Ingeniería Química*. Universidad de Málaga. <http://hdl.handle.net/10630/4981>
12. Martínez, C. (2021, 4 septiembre). Electrospinning. *My Nano Academy*. <https://www.mynanoacademy.com/post/electrospinning>

13. Ahmed, J. (2020). Electrospinning for the manufacture of biosensor components: A mini-review. *Medical Devices & Sensors*, 4(1). <https://doi.org/10.1002/mds3.10136>
14. Antonio, G. T. J., Luís, G. R. J., De València Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales - Escola Tècnica Superior D'Enginyers Industrials, U. P., & De València Departamento de Termodinámica Aplicada - Departament de Termodinàmica Aplicada, U. P. (2022, 13 octubre). *Diseño y puesta a punto de una cámara de electrohilado con control de temperatura y humedad ambiental*. <http://hdl.handle.net/10251/54698>
15. A. Calzón Gutiérrez, «Desarrollo de un equipo de electrospinning para obtención de nanofibras alineadas de recombinámeros tipo elastina» Universidad de Valladolid, Valladolid, 2016.
16. Namazi H. (2017). Polymers in our daily life. *BioImpacts : BI*, 7(2), 73–74. <https://doi.org/10.15171/bi.2017.09>
17. Ozdil, D., & Aydın, H. M. (2014). Polymers for medical and tissue engineering applications. *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology/Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(12), 1793-1810. <https://doi.org/10.1002/jctb.4505>
18. PCC Group. (2023, 7 septiembre). *Propiedades y Aplicaciones de los polímeros. ¿Dónde se utilizan los plásticos?* PCC Group Product Portal. <https://www.products.pcc.eu/es/blog/propiedades-y-aplicaciones-de-los-polimeros-donde-se-utilizan-los-plasticos/>
19. Gamboa, Wilson & Mantilla, O & Castillo, V. Producción de micro y nanofibras a partir de la técnica “Electrospinning” para aplicaciones farmacológicas.
20. Chen, H., Wu, Z., Su, Z., Hencz, L., Chen, S., Chen, Y., & Zhang, S. (2021b). A hydrophilic poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) polymer as a green, universal, and dual-functional binder for high-performance silicon anode and sulfur cathode. *Journal Of Energy Chemistry/Journal Of Energy Chemistry*, 62, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2021.03.015>
21. Mallavia, R., Falcó, A., & De Biología Molecular y Celular, I. (2017, 15 septiembre). *Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas*. <http://hdl.handle.net/11000/4491>
22. Mallavia, R. (2015, 17 junio). *Nanofibras poliméricas con ácido 5-aminolevulínico: preparación, caracterización y estudio de liberación in vitro*. <http://hdl.handle.net/11000/2103>
23. Rubio, M., Huertas, J., Alacid Martínez, Y., Martínez Tomé, M. J., Mallavia Marín, R., & Mateo, C. R. (2019). Nanopartículas y nanofibras de poli[metil vinil éter -alt- (anhídrido maleico)] (PMVEMA) y derivados para drug delivery. En J. M. García Pérez, S. Vallejos Calzada, F. C. García García, M. Trigo López, S. Ibeas Cortés, M. A. Muñoz Santamaría, A. Mendía Jalón, J. A. Reglero Ruiz, F. Serna Arenas, & I. Carreira Barral (eds.), *Polímeros para el siglo XXI: X Congreso de Jóvenes Investigadores en Polímeros (JIP 2019)*. Universidad de Burgos, 20-23 mayo de 2019 (Burgos, España).

24. Castañeda, P. S., Domínguez-Delgado, C. L., Cruz, I. M. R., Contreras, L. M. M., Trinidad, E. M. M., Cervantes, M. L., & Escobar-Chávez, J. J. (2020). Development of Poly (Methyl vinyl ether-alt-maleic acid) Microneedles for Transdermal Delivery of Atorvastatin Calcium. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21(9), 852-861.  
<https://doi.org/10.2174/1389201021666200217103302>
25. Varshosaz, J., Hassanzadeh, F., Sadeghi-Aliabadi, H., Larian, Z., & Rostami, M. (2014). Synthesis of Pluronic® F127-poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) copolymer and production of its micelles for doxorubicin delivery in breast cancer. *Chemical Engineering Journal*, 240, 133-146.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.086>
26. Larrañeta, E., Barturen, L., Ervine, M., & Donnelly, R. F. (2018). Hydrogels based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) and Tween 85 for sustained delivery of hydrophobic drugs. *International Journal Of Pharmaceutics*, 538(1-2), 147-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.025>
27. Rubio-Camacho, M., Martínez-Tomé, M. J., Mira, A., Mallavia, R., & Mateo, C. R. (2021). 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. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9607. <https://doi.org/10.3390/ijms22179607>
28. Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(03\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(03)00043-x)
29. Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A. A., Bot, J., Mccauley, R., & Hall, J. C. (2003). Glutathione. *ANZ Journal Of Surgery/ANZ Journal Of Surgery*, 73(7), 517-522. <https://doi.org/10.1046/j.1445-1433.2003.02682.x>
30. Sutariya, V., Wehrung, D., & Geldenhuys, W. J. (2012). Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for the Analysis of Reduced Glutathione. *Journal Of Chromatographic Science*, 50(3), 271-276.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>
31. Amariei, N., Manea, L. R., Berteau, A., Berteau, A., & Popa, A. (2017). The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures. *IOP Conference Series. Materials Science And Engineering*, 209, 012092.  
<https://doi.org/10.1088/1757-899x/209/1/012092>
32. Hong, T., Iwashita, K., & Shiraki, K. (2018). Viscosity Control of Protein Solution by Small Solutes: A Review. *Current protein & peptide science*, 19(8), 746–758. <https://doi.org/10.2174/1389203719666171213114919>
33. Fong, H., Chun, I., & Reneker, D. (1999). Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, 40(16), 4585-4592.  
[https://doi.org/10.1016/s0032-3861\(99\)00068-3](https://doi.org/10.1016/s0032-3861(99)00068-3)
34. *Técnicas - Espectroscopia Infrarroja - Caracterización de Materiales Cristalinos.* (s. f.). <https://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm>
35. *Tablas de espectroscopía.* (s. f.).

[https://www.ugr.es/~quioired/lab/tablas\\_espec/ir.htm](https://www.ugr.es/~quioired/lab/tablas_espec/ir.htm)

36. Rodríguez, E. M. (2005). *Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal*. Dialnet.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1143023>

