



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Desarrollo de nano y micropartículas basadas en hidrogeles: evaluación como sistemas de transporte/liberación controlada de fármacos**

**Autora: Carmen Fernández Álvarez**

**Tutor: Alfonso Fernández González**

**Cotutor: Cristian Chimeno Trinchet**

Oviedo, 14 de julio 2022

# ÍNDICE

---

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Fármacos y sistemas de liberación controlada de fármacos .....	1
1.2	Nano-hidrogeles de alginato .....	2
1.3	Moléculas modelo para la carga de hidrogeles .....	4
1.4	Métodos ópticos .....	5
1.4.1	Espectroscopía de absorción UV-VIS .....	6
1.4.2	Espectroscopía de fluorescencia.....	7
1.4.3	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).....	9
1.4.4	Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	10
1.5	Microscopio de transmisión electrónica (TEM) .....	11
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS .....	14
3.1	Materiales.....	14
3.2	Reactivos y disolventes.....	14
3.3	Instrumentación .....	15
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	16
4.1	Preparación de las disoluciones madre de fluoresceína y rodamina B .....	16
4.2	Preparación de las disoluciones para la encapsulación.....	16
4.3	Caracterización de las moléculas modelo .....	16
4.3.1	Espectrofotometría UV-VIS .....	16
4.3.2	Espectrometría de fluorescencia.....	17
4.3.3	Rendimiento cuántico de fluorescencia.....	17
4.3.4	Límites de detección de los métodos.....	17
4.4	Síntesis de los nano-hidrogeles <sup>16</sup> .....	18
4.4.1	Gel de alginato oxidado (OALG) .....	18

4.4.2	Síntesis del nano-hidrogel de alginato modificado con cistamina (OALG-CIS)	19
4.4.3	Síntesis del nano-hidrogel de alginato modificado con etilendiamina (OALG-ETA)	19
4.4.4	Encapsulación de las moléculas modelo de la liberación en los hidrogeles modificados	20
4.4.5	Recubrimiento del nano-hidrogel de alginato oxidado con mPEG-NH <sub>2</sub> (OALG-mPEG)	21
4.5	Caracterización de los nano-hidrogeles	23
4.6	Estudio de la liberación de las moléculas modelo	23
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1	Caracterización de las moléculas modelo	24
5.1.1	Determinación de las longitudes de onda de absorción	24
5.1.2	Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia	25
5.1.3	Rendimiento cuántico de fluorescencia	26
5.1.4	Cálculo de los límites de detección de los métodos y del coeficiente de absorción molar	26
5.2	Caracterización de los nano-hidrogeles	31
5.2.1	FTIR	31
5.2.2	DLS	33
5.2.3	TEM	35
5.3	Estudio comparativo de la capacidad de liberación y encapsulación de los nano-hidrogeles	36
5.3.1	Ensayos de encapsulación	36
5.3.2	Seguimiento de la liberación mediante espectrofluorimetría	38
6.	CONCLUSIONES	40
7.	BIBLIOGRAFÍA	41

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Fármacos y sistemas de liberación controlada de fármacos

El comité de Expertos de la OMS en Farmacodependencia define fármaco como “*toda sustancia que, introducida en el organismo vivo, puede modificar una o más de las funciones de este*”.<sup>1</sup> En términos farmacológicos, un fármaco o principio activo es una sustancia pura, químicamente definida, extraída de fuentes naturales o sintetizada en el laboratorio, dotada de una acción biológica, que puede o no ser aprovechada por sus efectos terapéuticos.<sup>2</sup> Para que el medicamento actúe sobre el organismo y trate la enfermedad, debe ser transportado hasta los sitios específicos del cuerpo y/o células dianas y ser liberado en ellas, por ello, actualmente existe una amplia investigación sobre la administración terapéutica.<sup>3</sup> El desarrollo de materiales transportadores/liberadores de fármacos eficaces que aumenten la selectividad de los transportadores y mejoren la entrega de medicamentos en zonas afectadas evitando así los efectos secundarios causados por los principios activos de la droga, ha aumentado el uso de biopolímeros, tales como los liposomas, polisacáridos, etcétera.<sup>4,5</sup>

Los sistemas de liberación de fármacos (*drug delivery systems, DDS*) se definen como elementos que permiten la introducción de la sustancia terapéutica en el cuerpo mejorando su eficacia y seguridad con respecto a las terapias tradicionales, al controlar la velocidad, tiempo y lugar de su liberación.<sup>6,7</sup> Este proceso incluye desde la administración del fármaco hasta su transporte por las membranas biológicas para llegar al sitio de acción. A cada medicamento le corresponde un DDS único capaz de ejercer su liberación de manera eficiente y sin generar efectos adversos secundarios, y, a diferencia de las terapias tradicionales, están diseñados para mantener los niveles terapéuticos estables durante todo el periodo del tratamiento.<sup>8</sup>

El medicamento puede administrarse por diferentes vías en función de la enfermedad que el individuo presente, el efecto deseado y el producto disponible. Las rutas anatómicas principales se muestran en la *Tabla 1*.

**Tabla 1: Posibles rutas anatómicas para la administración de DDS<sup>6</sup>**

Gastrointestinal
Oral
Rectal
Subcutánea
Intramuscular
Intravenosa
Intraarterial
Transmucosal
Pulmonar

Un sistema inteligente de administración de fármacos debe superar todas las limitaciones e inconvenientes asociados a los agentes terapéuticos convencionales, como la imposibilidad de aplicarse al mismo tiempo que otros principios activos y la falta de especificidad en el transporte al sitio de acción haciendo que el fármaco se pierda en los tejidos no enfermos del huésped. <sup>8</sup> Además, debe poseer las propiedades características de biodegradabilidad y sobre todo de biocompatibilidad, así como anti-toxicidad.<sup>9</sup>

El uso de estos novedosos DDS, como ya se ha explicado, conlleva ventajas frente al tratamiento tradicional, como puede ser conseguir la reducción de la frecuencia de administración y dosis del fármaco a la vez que se reduce también la fluctuación de las concentraciones plasmáticas para minimizar así los efectos secundarios del medicamento. También se produce un control del sitio de liberación del fármaco en el tracto gastrointestinal liberando el fármaco directamente en el intestino delgado. Esto permite proteger al principio activo de la degradación por el ácido del estómago y también proteger teóricamente el estómago de una posible acción gastro-lesiva del medicamento. En cuanto a las limitaciones, cabría destacar el riesgo de liberar una dosis alta de fármaco en forma inmediata por un fallo del sistema, y el mayor coste de diseño y producción.<sup>7,10,11</sup>

## 1.2 Nano-hidrogeles de alginato

Los polisacáridos han demostrado ser materiales muy útiles para la síntesis de sistemas de liberación de fármacos (DDS) debido a varios factores como su alta

estabilidad (permitiendo así la formación de hidrogeles), biodegradabilidad y biocompatibilidad, pero su mayor atractivo radica, como ya se ha comentado, en la no toxicidad del polímero. Además, otra importante ventaja es su abundancia en la naturaleza, lo que hace que los procesos de extracción sean de bajo costo. Este es el caso, por ejemplo, del alginato, extraído de las algas pardas (*Phaeophyceae*).<sup>4,5,12</sup>

El alginato (ALG) es un polímero natural aniónico con alto poder de gelificación obtenido por precipitación con cloruro de sodio o calcio previa extracción de las algas. Se trata de un polímero no ramificado constituido por los monosacáridos D-manurónico (M) y su epímero L-gulurónico (G) unidos por enlace O-glucosídico intercalados alternamente.<sup>3,12-14</sup>

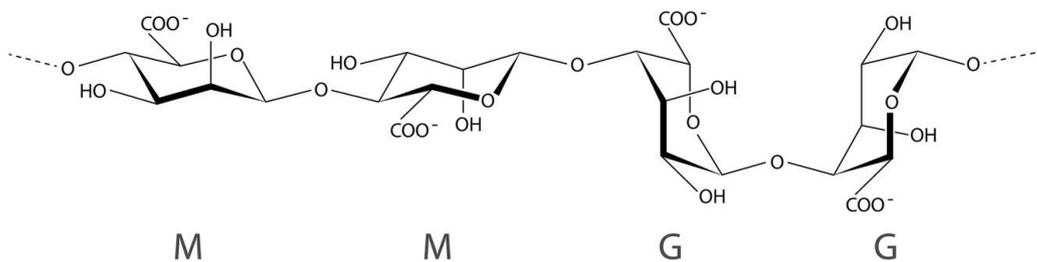


Ilustración 1: Estructura química del alginato<sup>15</sup>

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales con alto contenido en agua sintetizados por entrecruzamiento físico o químico de polímeros hidrofílicos. Presentan ventajas como la biocompatibilidad, gran flexibilidad y el excelente rendimiento de encapsulación del fármaco. En particular, los nano-hidrogeles responden a estímulos con propiedades químicas y físicas únicas y ajustables en sistemas de administración de fármacos (DDS). Las características que deben poseer estos nano-hidrogeles son:

- Tamaño adecuado por debajo de 100 nm en cada dimensión en 35 medios fisiológicos para garantizar la permeabilidad a través de las membranas de las células enfermas y una absorción exitosa
- Tiempo de activación largo en el cuerpo humano
- Mayor capacidad de carga de drogas que los sistemas tradicionales
- Gran capacidad de respuesta inteligente a los estímulos para controlar con precisión la actuación en los sitios específicos (células infectadas)
- Máxima biodegradabilidad posible después de la liberación del fármaco<sup>9,16-19</sup>

Los hidrogeles de ALG se pueden preparar mediante varios métodos de reticulación. Su similitud estructural con las matrices extracelulares de los tejidos vivos les

proporciona una amplia aplicación en la cicatrización de heridas y en la administración de agentes bioactivos, como proteínas y fármacos químicos pequeños. En esta última aplicación, la más relevante para este trabajo, los fármacos pueden liberarse de los geles de alginato de forma controlada, según los tipos y métodos de entrecruzamiento empleados en la síntesis. Además, estos geles se pueden administrar de forma oral o por inyección poco invasiva, lo que les confiere una amplia aplicabilidad en el ámbito farmacéutico.<sup>12</sup> La formación del nano-hidrogel está impulsada por las interacciones entre los bloques de L-gulurónico (G), que se asocian formando uniones enérgicas en presencia de cationes divalentes. Es por esto que los geles con alto contenido de monómero G producen geles más estables y fuertes.<sup>14</sup>

Para garantizar la estabilidad de los hidrogeles basados en ALG en el flujo sanguíneo y mejorar aún más su biocompatibilidad, se puede realizar el recubrimiento del mismo con Metoxipoli(etilenglicol) amina.<sup>16</sup>

### 1.3 Moléculas modelo para la carga de hidrogeles

Con el fin de realizar el seguimiento de la liberación del fármaco del DDS, en el presente Trabajo Fin de Máster se hace uso de dos moléculas fluorescentes: la fluoresceína y la rodamina B.

La fluoresceína es una sustancia pulverulenta de color amarillo rojizo con peso molecular de 376,27 g/mol soluble en etanol y aguas alcalinizadas, por ello, su sal sódica es soluble en agua (pH > 7). Esta sal es usada como marcador fluorescente debido a su capacidad de producir fluorescencia.

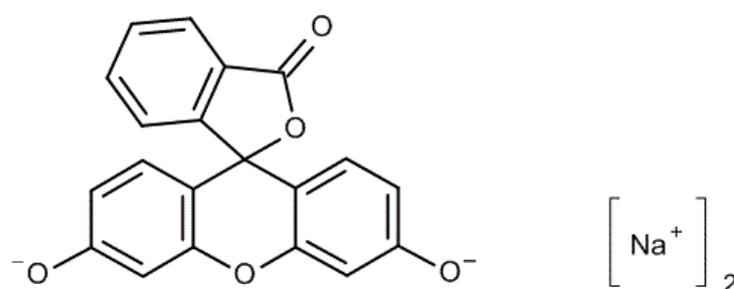


Ilustración 2: Estructura de la fluoresceína sódica

La rodamina B es una sustancia pulverulenta de color violeta con peso molecular de 479,01 g/mol insoluble en agua, pero soluble en etanol. También presenta fluorescencia por lo que su uso está extendido como marcador fluorescente al igual que la fluoresceína.

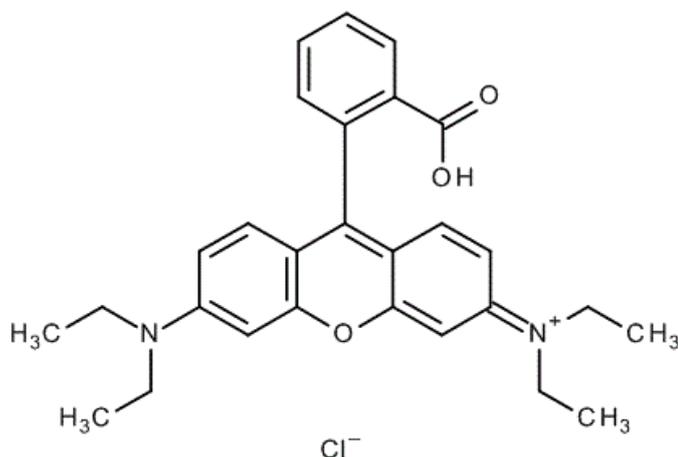


Ilustración 3: Estructura de la rodamina B

## 1.4 Métodos ópticos

Los métodos ópticos de análisis están basados en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Cuando dicha radiación incide sobre una muestra material, esta puede: ser absorbida por la muestra; ser dispersada, con o sin cambio en la longitud de onda; u originar un cambio en las propiedades de radiación, sin necesidad de producirse absorción o emisión.

Existen dos tipos de métodos ópticos:

- Métodos espectroscópicos: en los que existe intercambio de energía entre la radiación electromagnética y la materia debido a que las interacciones son profundas. En esta metodología se miden cambios en la intensidad de la radiación emitida debido a las transiciones entre niveles energéticos. Se dan procesos de absorción (p.e espectrofotometría UV-visible, IR, microondas, absorción atómica, etcétera) y procesos de emisión (fluorescencia de rayos X, fluorescencia atómica y molecular, etcétera).

- Métodos no espectroscópicos: en los que no tiene lugar intercambio de energía como consecuencia de que la interacción materia-radiación es poco profunda. No se producen transiciones entre los diferentes estados energéticos, sino que se producen

cambios en la dirección o en las propiedades físicas de la radiación electromagnética. Se basan en la naturaleza ondulatoria de la radiación y generan procesos de dispersión (turbidimetría, nefelometría, RAMAN), refracción (reflectometría, interferometría), difracción (rayos X, electrónica), reflexión (espectroscopía de reflexión) y en rotación óptica (polarimetría, dicroísmo circular).



Ilustración 4: Diagrama del espectro de la radiación electromagnética<sup>20</sup>

En el presente Trabajo Fin de Máster se hará uso de los métodos espectroscópicos de absorción UV-VIS, FTIR y espectroscopía de fluorescencia, así como uno no espectroscópico, la dispersión dinámica de la luz (DLS).

#### 1.4.1 Espectroscopía de absorción UV-VIS

Este método espectrofotométrico se basa en la medida de la absorbancia o transmitancia de la radiación en la región ultravioleta o visible, normalmente entre los 170-200 y los 650-800 nm). La absorbancia puede correlacionarse con la concentración de la especie absorbente mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = -\log(T) = C * b * \epsilon$$

Donde A es la absorbancia, T la transmitancia, C la concentración, b el camino óptico y  $\epsilon$  el coeficiente de absorción molar.

El esquema general instrumental se ve en la siguiente ilustración:

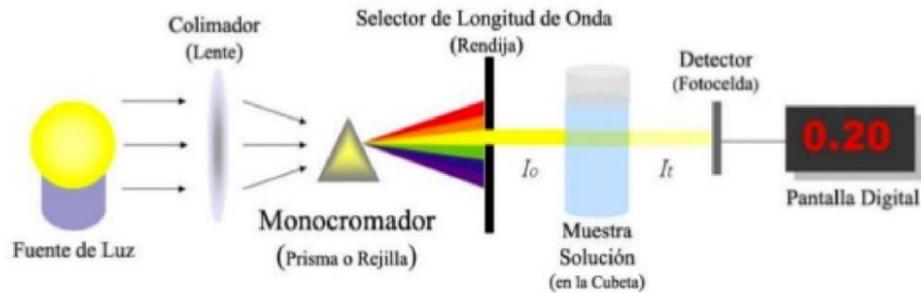


Ilustración 5: Esquema del espectrofotómetro de absorción UV-VIS<sup>21</sup>

Como se observa, el haz de la fuente pasa por el selector de longitud de onda y luego atraviesa la muestra. Existen instrumentos de doble haz y de haz sencillo. En los segundos, hay solo un haz de radiación que, después de pasar a través de la muestra, llega al detector, por lo que la corrección del blanco debe realizarse previamente. En cambio, en los de haz doble, la radiación pasa alternativa o simultáneamente a través de la muestra y del blanco, lo cual se lleva a cabo mediante un motor que hace girar un espejo dentro y fuera de la trayectoria de la radiación.

#### 1.4.2 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno luminiscente que caracteriza a las sustancias que absorben energía en forma de radiación, y, tras excitarse desde el nivel fundamental hasta un estado singlete excitado, emiten parte de esa energía en forma de luz. La energía de la emisión siempre será menor que la energía de la radiación incidente, por lo que la longitud de onda será mayor. El mecanismo de fluorescencia implica tres pasos:

- 1- Absorción de la radiación
- 2- Relajación no radiativa (calor)
- 3- Emisión

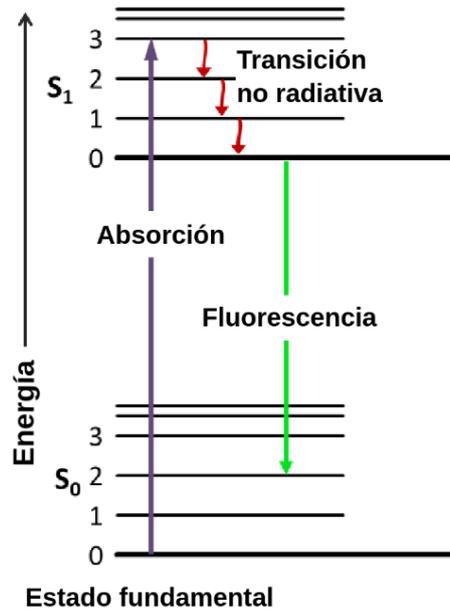


Ilustración 6: Diagrama de Jablonski de la fluorescencia<sup>22</sup>

Estos tres procesos se dan en el orden de los nanosegundos. Esto es debido a que la absorción y relajación son procesos muy rápidos, y la emisión en este tipo de luminiscencia es una transición permitida del primer estado singlete hasta el fundamental, por lo que se considera un proceso instantáneo, una vez que cesa la radiación incidente cesa también la fluorescencia.

El esquema instrumental es muy similar al del espectrofotómetro anterior con la salvedad de que en este caso se hace uso de dos selectores de longitudes de onda, el de excitación, antes de la muestra y el de emisión, después de la misma.

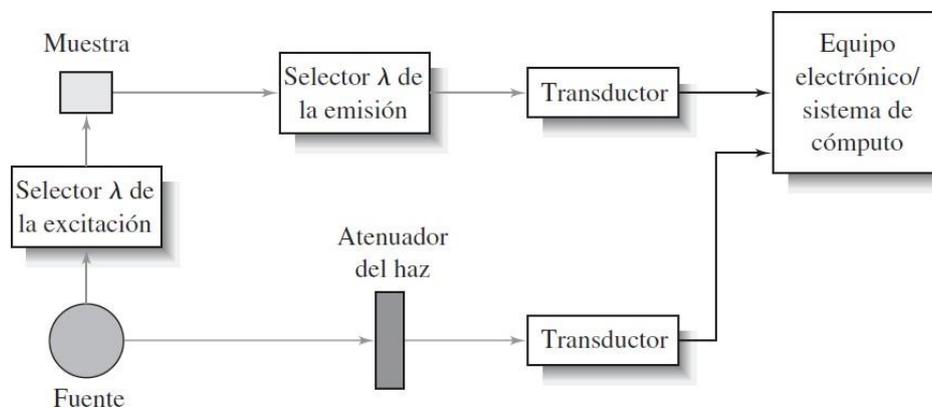


Ilustración 7: Esquema del espectrofotómetro de fluorescencia<sup>23</sup>

Cabe destacar que el detector se encuentra a 90° de la fuente para que no haya interferencias de la luz incidente. Registrar la emisión con ese ángulo es posible ya que la fluorescencia es un proceso que ocurre en todas las direcciones.

### 1.4.3 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La radiación infrarroja no es suficientemente energética para producir la clase de transiciones electrónicas que se dan mediante radiaciones ultravioleta y visible. La escala energética a la que se produce se corresponde con los niveles energéticos vibratorios de las moléculas, por lo que, por condicionamientos mecano-cuánticos, esta técnica se limita a especies moleculares con transiciones vibracionales que experimenten un cambio en el momento dipolar.

Existen tres tipos de equipos de radiación IR: espectrofotómetros dispersivos con monocromador de red, espectrofotómetros de transformada de Fourier y espectrofotómetros no dispersivos con filtro. En la actualidad, los más usados son los de transformada de Fourier.

La transformada de Fourier convierte la salida del detector en un espectro interpretable. Tienen pocos elementos ópticos y ninguna rendija que atenúe la radiación, siendo la potencia radiante que llega al detector muy elevada, además de llegar todos los elementos de la fuente simultáneamente, obteniendo el espectro casi al instante. La resolución es alta, igual que la capacidad de reproducción de la longitud de onda. En la *Ilustración 8* se puede ver un esquema de este equipo.

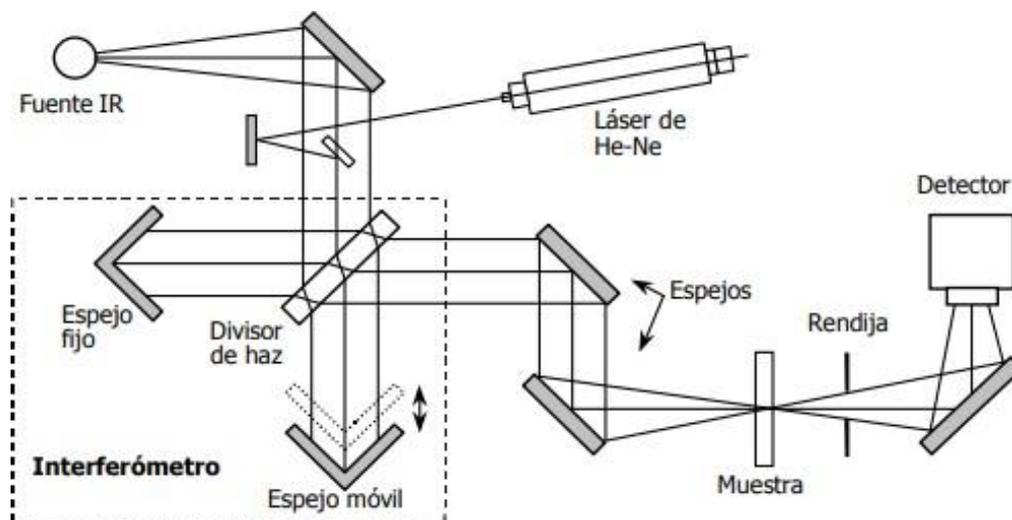


Ilustración 8: Esquema del equipo FTIR<sup>23</sup>

Como se observa, cuenta con un interferómetro de Michelson constituido por dos espejos, uno móvil y uno fijo, y un divisor de haz. Al incidir la luz de la fuente sobre el divisor de haz, esta se divide en dos rayos que se reflejan en cada uno de los espejos y retornan al divisor de haz, donde se combinan y salen del interferómetro. La combinación de ambos puede ser constructiva (aumento de señal) o destructiva (disminución de señal), en función de la posición del espejo móvil. Esta combinación es la que llega al detector después de pasar por la muestra, y genera un espectro gracias al tratamiento matemático de la transformada de Fourier.

#### 1.4.4 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se trata de una técnica fisicoquímica no destructiva establecida para medir el tamaño (radio hidrodinámico) y la distribución de tamaño de moléculas y partículas, típicamente en la región micrométrica y nanométrica.<sup>24</sup> La DLS consiste en hacer incidir sobre la muestra un haz de luz y monitorizar los fotones dispersos en ángulos específicos durante intervalos de tiempo del orden de los microsegundos. En estos intervalos de tiempo la señal fluctúa en función del tamaño de las partículas que haya en suspensión. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y generan más fluctuaciones en la intensidad de la dispersión de luz, mientras que las partículas más grandes se mueven más lentamente por lo que provocan menores variaciones.

Los parámetros más importantes de esta técnica son el tamaño promedio  $z$  y el índice de polidispersión.

El tamaño promedio  $z$  es el parámetro principal y el más estable generado por la técnica. Constituye el mejor valor que se puede informar en un entorno de control de calidad, dado que se encuentra definido en la norma ISO 13321 y, más recientemente, en la norma ISO 22412, que define esta media como el “*diámetro de partícula armónico ponderado por intensidad*”. Este parámetro es muy sensible a pequeños cambios en la muestra, como puede ser la presencia de pequeños agregados en la misma. Cabe destacar que el tamaño promedio  $z$  es un parámetro hidrodinámico y, por lo tanto, solo se aplica a partículas que se encuentran en dispersión o a moléculas en solución.<sup>24</sup>

Por su parte, el índice de polidispersión consiste en un número que se calcula a partir de 2 parámetros que se ajustan a los datos de correlación (análisis de cumulantes). El índice de polidispersión es adimensional, y se escala de tal modo que los valores inferiores

a 0,05 rara vez se observan, excepto con patrones altamente monodispersos. Los valores mayores a 0,7 indican que la muestra posee una distribución muy amplia, y probablemente no sea apta para la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS).<sup>24</sup>

A continuación, se muestra un esquema de la instrumentación del DLS.

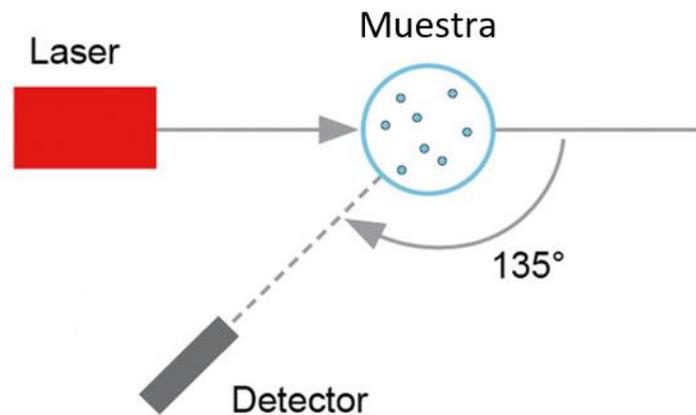


Ilustración 9: Esquema del equipo DLS<sup>25</sup>

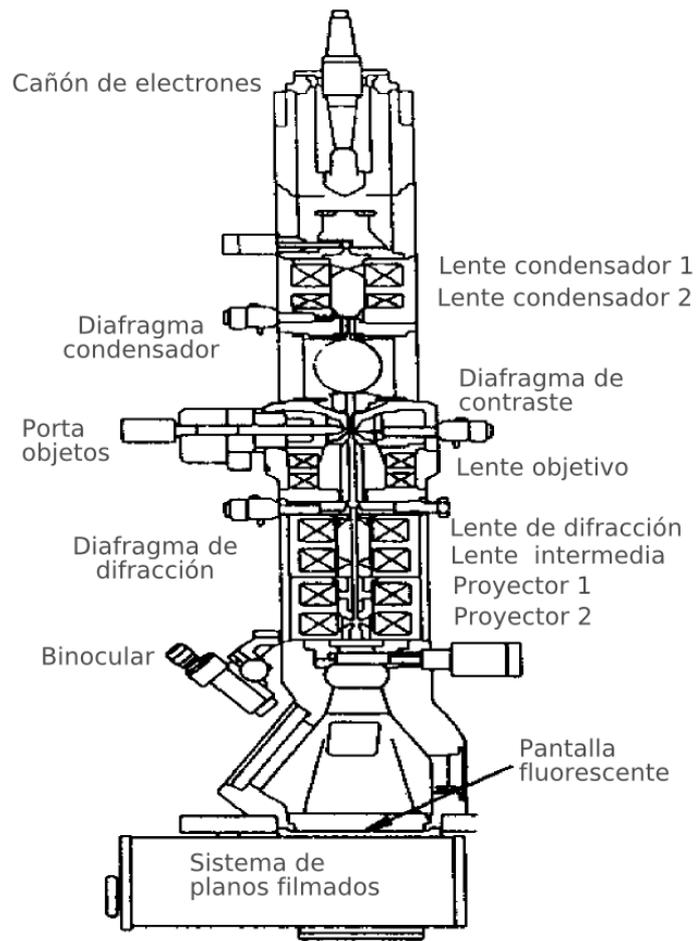
### 1.5 Microscopio de transmisión electrónica (TEM)

El microscopio de transmisión electrónica emplea un haz de electrones altamente energético que atraviesa la muestra para generar una imagen de la misma, por lo que proporciona información estructural. Además, posee una resolución a alta magnificación inferior a 1 nm. Es por esto por lo que se trata de una herramienta muy útil para la nanotecnología.

Un microscopio TEM presenta los siguientes componentes:

- Cañón de electrones, localizado en la parte superior de la columna del equipo
- Columna, que contiene el sistema de lentes electromagnéticas, responsables de dar forma al haz de electrones. Es importante que el cañón de electrones se encuentre a vacío para evitar que los electrones acelerados colisionen y haya pérdida energética
- Detectores
- Cámara de muestra, con uno o varios pozos
- Sistema de captura de imágenes

En la *Ilustración 10* se pueden observar dichos componentes.



**Ilustración 10:** Esquema del equipo TEM<sup>26</sup>

## 2. OBJETIVOS

---

La eficacia de los medicamentos se ve limitada por la baja capacidad de la sustancia para alcanzar el lugar en el que debe actuar en el organismo. Esto puede deberse a factores tanto físicos como químicos, y es lo que se pretende mejorar con el desarrollo de sistemas dispensadores de fármacos (DDS).

Los objetivos principales del presente trabajo son dos:

- ✓ La síntesis y caracterización fisicoquímica de distintos tipos de hidrogeles basados en alginato
- ✓ El estudio de la capacidad de dichos materiales como sistemas de liberación de fármacos

Estos objetivos generales pueden subdividirse a su vez en varios objetivos particulares:

- ✓ Síntesis de hidrogeles de alginato modificados con cistamina cargados con dos moléculas modelo diferentes, fluoresceína y rodamina
- ✓ Síntesis de hidrogeles de alginato modificados con etilendiamina cargados con las dos moléculas modelo diferentes, fluoresceína y rodamina
- ✓ Síntesis de hidrogeles de alginato modificados con cistamina y recubiertos con mPEG-NH<sub>2</sub> cargados con rodamina
- ✓ Caracterización fisicoquímica de ambas moléculas modelo, fluoresceína y rodamina
- ✓ Caracterización fisicoquímica de los nano-hidrogeles
- ✓ Comparación de todos los tipos de nano-hidrogeles en cuanto a la capacidad de encapsulación y liberación de las moléculas modelo

## 3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

---

### 3.1 Materiales

- Vasos de precipitados (10, 10, 100, 250, 500 mL)
- Pipetas pasteur
- Micropipetas HTL (0,5-10, 10-100, 100-1000  $\mu$ L)
- Matraces aforados (5, 10, 25, 100, 250, 500 mL)
- Probetas (10, 50 mL)
- Falcon (15, 50 mL)
- Imán
- Barras magnéticas
- Cubeta de cuarzo con 10 mm de paso óptico

### 3.2 Reactivos y disolventes

- Agua MilliQ
- Etanol absoluto de Labkem
- Metanol de Labkem
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Gibco
- HCl 37% de Sigma Aldrich
- NaOH 98% de Alfa Aesar
- Ácido acético glacial de Sigma Aldrich
- Alginato de sodio de Acros organics
- Peryodato de sodio de Merck
- Metoxipoli(etilenglicol) amina (mPEG-NH<sub>2</sub>) de ThermoFisher
- Dihidrocloruro de cistamina de ThermoFisher
- Etilendiamina de Sigma Aldrich
- Hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) de Sigma Aldrich
- N-hidroxisuccinimida (NHS) de Sigma Aldrich
- Fluoresceína sódica de Merck
- Rodamina B de Sigma Aldrich

### 3.3 Instrumentación

- Espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse
- Software Cary Eclipse Varian Scan Application
- Espectrofotómetro UV-Visible 50 BIO Varian Cary
- Software Varian Cary WinUV Scan Application
- Espectrómetro de fluorescencia Edinburgh FS5 con accesorio de esfera integradora
- Software Fluoracle
- 670-FT-IR con módulo ATR Golden-Gate (cristal de diamante)
- Software Resolutions Proversión 5
- TEM JEOL JEM-2000 EX II Electron Microscope
- Software Gatan Digital Micrograph
- Malvern Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 DLS
- Zetasizer Software DLS
- Agitador rotatorio Sky-line RM-2L ELMI
- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo AE 163
- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo PG802-S
- pH-metro Crison micro pH 2002
- Vortex Labnet VX 100
- Centrífuga Labofuge 200 Thermo Electron Corporation
- Centrífuga Gyrozen 1580 R Control Técnica
- Ultrasonidos H-P Selecta
- Agitador magnético con calefacción Lbx Instruments H03D Series
- Agitador magnético con calefacción P Selecta AGIMATIC-E
- Membranas de diálisis de celulosa de anchura 25 mm Sigma Aldrich

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 4.1 Preparación de las disoluciones madre de fluoresceína y rodamina B

Se prepararon dos disoluciones madre, una de cada fluoróforo, por pesada directa y disolución, que posteriormente se usaron para realizar los calibrados por dilución. En el caso de la fluoresceína se pesaron 0,0059 g y se enrasó a 10 mL con agua MilliQ obteniendo así una disolución madre  $1,57 \cdot 10^{-3}$  M. Para la rodamina se pesaron 0,0057 g y se enrasó a 50 mL con EtOH obteniendo así una disolución madre  $2,13 \cdot 10^{-4}$  M.

### 4.2 Preparación de las disoluciones para la encapsulación

Ambas disoluciones se prepararon por pesada directa y disolución. Para la fluoresceína se pesaron 0,0101 g y se llevaron a 10 mL enrasando con agua MilliQ obteniendo así una disolución de  $2,66 \cdot 10^{-3}$ . Para la rodamina se pesaron 0,0102 g y se llevaron a 10 mL enrasando con etanol obteniendo así una disolución de  $1,87 \cdot 10^{-3}$ .

### 4.3 Caracterización de las moléculas modelo

La caracterización de las moléculas modelo se llevó a cabo mediante la determinación de sus características espectroscópicas: longitud de onda del máximo de absorción, coeficiente de absorción molar, longitudes de onda de excitación y emisión máxima de fluorescencia, rendimiento cuántico de fluorescencia y espectro de absorción de infrarrojo medio.

#### 4.3.1 Espectrofotometría UV-VIS

Se realizó un barrido en todo el espectro visible (400-700 nm) de las disoluciones de concentración  $5 \cdot 10^{-6}$  M preparadas por dilución de las disoluciones madre para la determinación de las longitudes de onda de absorción.

Para la línea de calibrado de la fluoresceína se realizó un barrido de 400 nm a 500 nm, mientras que en el caso de la rodamina el barrido fue de 500 nm a 600 nm. Los rangos de los barridos se eligieron de manera acorde a las longitudes de onda de absorción de las especies. Cabe destacar que para ambos fluoróforos se realizó la corrección de la línea base. Para la fluoresceína con agua MilliQ y para la rodamina con etanol.

### 4.3.2 Espectrometría de fluorescencia

Una vez obtenidos los valores de las longitudes de onda de absorción máxima para los dos fluoróforos se procedió a determinar las longitudes de onda de emisión y excitación de fluorescencia. Para ello, primero se configuraron las aperturas de las rendijas del fluorímetro en 5 nm tanto la de emisión como la de excitación. Después, se fijó el valor de la longitud de onda de absorción como longitud de onda de excitación, obteniendo así el espectro de emisión de las especies. Con el valor de longitud de onda de emisión que se obtuvo de este espectro se procedió a realizar el espectro de excitación fijando esta vez el valor de emisión. El valor obtenido de la longitud de onda de excitación en este espectro es el óptimo, por lo que se fijó como  $\lambda_{exc}$  y con ella se realizó el espectro de emisión definitivo con el que se conoció la longitud de onda de emisión de las especies ( $\lambda_{em}$ ).

### 4.3.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico, relación de fotones emitidos por una especie respecto a los absorbidos de la fuente, se realizó por el método directo empleando una esfera integradora acoplada a un espectrómetro de fotoluminiscencia.

### 4.3.4 Límites de detección de los métodos

El límite de detección (LD) se define como la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, y, por tanto, distinguida del ruido con fiabilidad, y depende del tipo de analito, del equipo de medida y de las condiciones del análisis.

#### 4.3.4.1 Caracterización espectrofotométrica

En el espectrofotómetro UV-VIS se realizaron calibrados para ambas especies empleando las concentraciones resumidas en la *Tabla 2*.

Tabla 2: Concentraciones de fluoresceína y rodamina para la determinación del LD y el coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ )

[Fluoresceína] (mol/L)	[Rodamina] (mol/L)
1,00E-06	9,80E-07
2,51E-06	2,51E-06
4,99E-06	4,98E-06
7,54E-06	7,50E-06
1,00E-05	1,00E-05

Con este mismo calibrado, y gracias a la anteriormente mencionada Ley de Lambert-Beer (apartado 1.4.1) se calcularon los coeficientes de absortividad molar de ambas especies.

#### 4.3.4.2 Condiciones del fluorímetro

Las técnicas luminiscentes presentan límites de detección inferiores a la espectrofotometría, ya que tienen una sensibilidad superior. Por ello, en este caso se emplearon concentraciones menores, de acuerdo a lo que se recoge en la *Tabla 3*.

**Tabla 3: Condiciones de análisis para la fluoresceína y rodamina**

	Fluoresceína	Rodamina
Rango de C (mol/L)	$10^{-9}$ , $5 \cdot 10^{-9}$ , $10^{-8}$ , $5 \cdot 10^{-8}$	$10^{-9}$ , $3,5 \cdot 10^{-9}$ , $6,5 \cdot 10^{-9}$ , $10^{-8}$
Apertura rendija emisión (nm)	20	20
Apertura rendija excitación (nm)	20	20
$\lambda_{exc}$ (nm)	470	535
Rango de barrido (nm)	500-600	560-600

## 4.4 Síntesis de los nano-hidrogeles<sup>16</sup>

### 4.4.1 Gel de alginato oxidado (OALG)

Se pesaron 1,0014 g de alginato de sodio y se disolvieron mediante agitación con 150 mL de agua MilliQ. A su vez, se pesaron 0,8666 g de peryodato de sodio (oxidante) y se disolvieron también mediante agitación en 20 mL de agua MilliQ. Una vez ambos reactivos se disolvieron completamente por separado, se añadieron los 20 mL de la disolución del oxidante a la disolución de alginato. Tras la agitación pertinente para homogeneizar la disolución, la reacción se dejó a temperatura ambiente en oscuridad durante la noche (sin agitación). El producto se separó mediante precipitación con 200 mL de EtOH durante otra noche. La separación se llevó a cabo mediante centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos, decantación del sobrenadante y posterior lavado con una mezcla etanol/agua 1:1 v/v. El gel de alginato oxidado, producto final, se dejó secando a vacío durante 3 días.

#### 4.4.2 Síntesis del nano-hidrogel de alginato modificado con cistamina (OALG-CIS)

Se pesaron 0,0813 g del gel de alginato oxidado y se disolvieron en 5 mL de PBS a pH 6,59 con ayuda del agitador magnético. Una vez disuelto por completo se adicionaron, para activar los grupos carboxilo del alginato, 0,472 g de EDC y 0,0148 g de NHS previamente disueltos en un volumen pequeño de agua MilliQ, en intervalos de 15 minutos y en ese orden. Por último, se añadieron 0,0248 g de cistamina y se dejó reaccionando con agitación durante 2 días (disolución de color marrón). El producto final se separó mediante precipitación con 10 mL de etanol centrifugando a 5000 rpm durante 5 minutos y posterior lavado con una mezcla etanol/agua 1:1 v/v. El secado se realizó a temperatura ambiente durante un fin de semana.

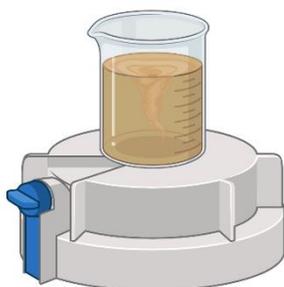
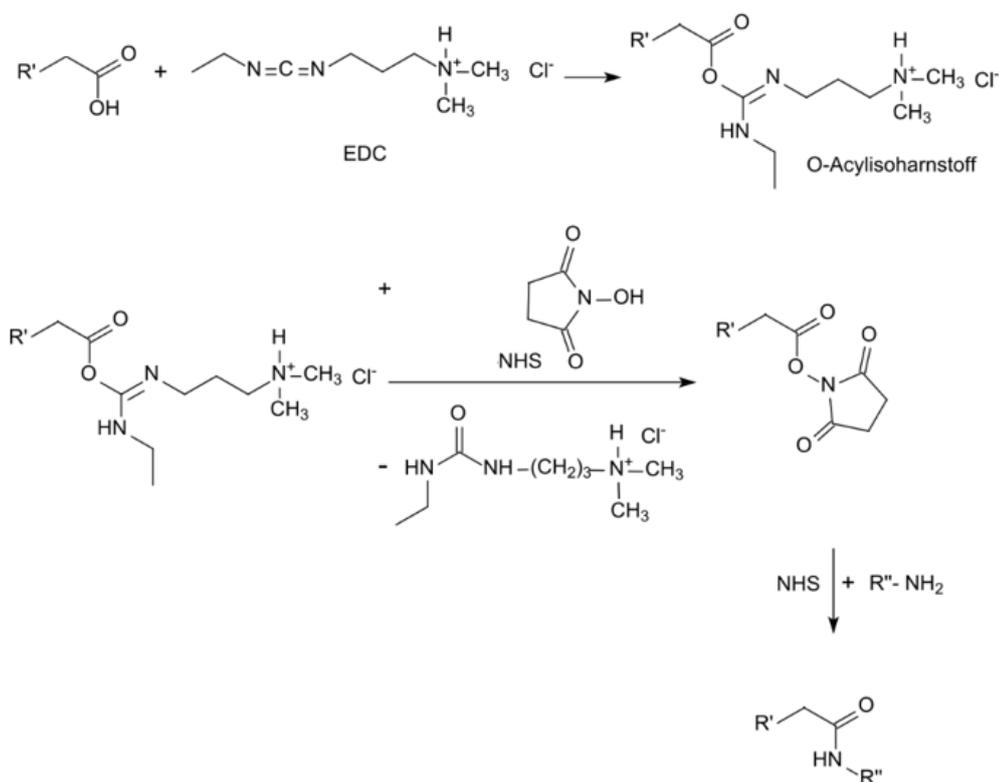


Ilustración 11: Síntesis del hidrogel de alginato modificado con cistamina

#### 4.4.3 Síntesis del nano-hidrogel de alginato modificado con etilendiamina (OALG-ETA)

Se pesaron 0,0812 g del gel de alginato oxidado y se disolvieron en 5 mL de PBS a pH 6,59 con ayuda del agitador magnético. Una vez disuelto por completo se adicionaron, para activar los grupos carboxilo del alginato, 0,468 g de EDC y 0,0150 g de NHS previamente disueltos en un volumen pequeño de agua MilliQ, en intervalos de 15 minutos y en ese orden. Por último, se añadieron 7,4  $\mu$ L de etilendiamina y se dejó reaccionando con agitación durante 2 días (disolución de color amarillento). El producto final se separó mediante precipitación con 10 mL de etanol centrifugando a 5000 rpm durante 5 minutos y posterior lavado con una mezcla etanol/agua 1:1 v/v. El secado se realizó a temperatura ambiente durante un fin de semana.

A modo de ejemplo a continuación se muestra la reacción de activación de los grupos carboxílicos anteriormente mencionada.

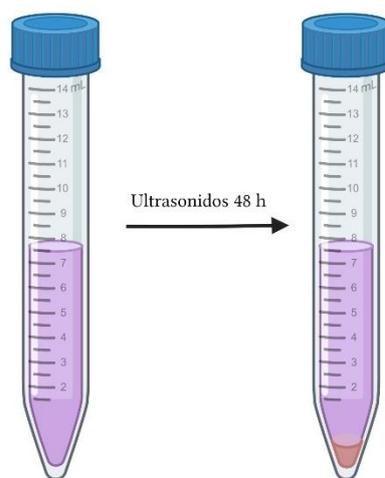


**Ilustración 12:** Reacción de activación de los grupos carboxílicos con EDC y NHS donde R''-NH<sub>2</sub> sería cistamina o etilendiamina

#### 4.4.4 Encapsulación de las moléculas modelo de la liberación en los hidrogeles modificados

Se procedió de igual modo para la rodamina y la fluoresceína y para los dos tipos de nano-hidrogeles modificados.

Se pesaron 0,0050 g del nano-hidrogel y se añadieron a una disolución mezcla de pH 7,4 (volumen total constante de 5 mL enrasado con una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v/v) que contenía: 2,5 mL de una disolución 1 mg/mL del fluoróforo y 20 µL de ácido acético glacial (catalizador). La mezcla se hizo reaccionar con ayuda del ultrasonido en oscuridad durante 48 horas para producir así un precipitado de color rojo oscuro. Los nano-hidrogeles con las moléculas modelo encapsuladas se separaron igual que en los casos anteriores, por centrifugación y lavado con etanol, dejándose secar al aire.



**Ilustración 13: Ejemplo de la síntesis de encapsulados para la rodamina**

En todos los casos se observó la formación de precipitado con la rodamina, sin embargo, en ningún caso se observó aparición de precipitado con la fluoresceína. Por este motivo los posteriores análisis solo se llevaron a cabo con rodamina.

Con objeto de cuantificar el rendimiento de encapsulación se llevó a cabo una determinación espectrofotométrica de la cantidad de molécula molde remanente en el sobrenadante tras la primera centrifugación.

#### 4.4.5 Recubrimiento del nano-hidrogel de alginato oxidado con mPEG-NH<sub>2</sub> (OALG-mPEG)

Se pesaron 0,2264 g del gel de alginato oxidado y se disolvieron en 20 mL de una disolución de PBS a pH 5,54. Una vez disuelto por completo se añadieron, secuencialmente en intervalos de 15 minutos, 0,0458 g de EDC y 0,0153 g de NHS (activación de los grupos carboxílicos). Pasados otros 15 minutos se adicionaron 0,3386 g del agente recubridor mPEG-NH<sub>2</sub> disuelto en 5 mL de PBS. Tras la adición de este último reactivo se reajustó el pH a 5,97 con NaOH y se dejó reaccionando con agitación durante 2 días a temperatura ambiente. El producto final se obtuvo precipitando con 10 mL de etanol durante una tarde. Posteriormente, el precipitado se centrifugó a 5200 rpm durante 10 minutos y se lavó con etanol hasta que las aguas madres fueron transparentes. El secado se realizó a vacío durante 3 horas.

Con el gel recubierto se realizó la síntesis del hidrogel de cistamina de igual modo que en el apartado 4.4.2 y la encapsulación con rodamina como en el apartado 4.4.3.

A continuación, se muestra un esquema de la síntesis de los nano-hidrogeles y de la nanopartícula que se espera sintetizar tras la encapsulación.

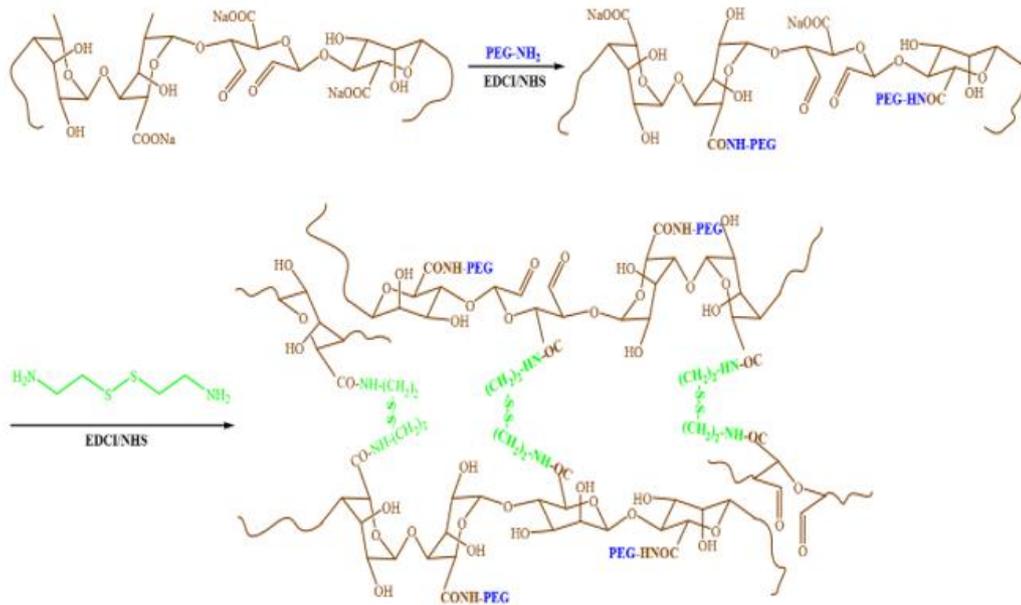


Ilustración 14: Esquema de síntesis del hidrogel de alginato recubierto con mPEG-NH<sub>2</sub> modificado con cistamina<sup>16</sup>

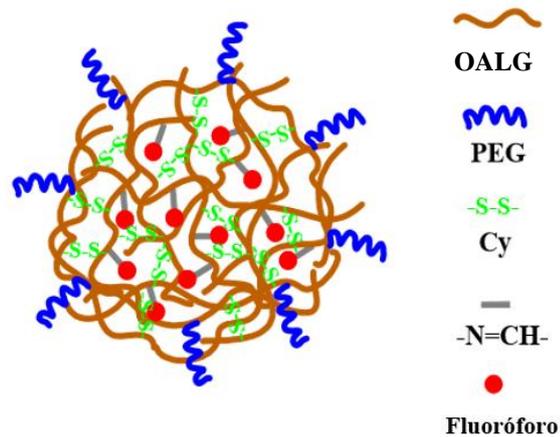


Ilustración 15: Esquema de la nanopartícula que se pretende sintetizar<sup>16</sup>

#### 4.5 Caracterización de los nano-hidrogeles

Con el fin de comprobar que la gelificación ha sido exitosa se analizan los geles sintetizados por tres técnicas diferentes: TEM, DLS y FTIR.

Gracias al DLS, como ya se ha comentado, se consigue determinar el radio hidrodinámico de las nanopartículas, así como el porcentaje de polidispersión. En cuanto al TEM, proporciona información del tamaño de partícula. Por último, el FTIR indica el tipo de enlaces y ofrece información estructural.

#### 4.6 Estudio de la liberación de las moléculas modelo

Uno de los objetivos del presente trabajo es el estudio comparativo del comportamiento liberador de los nano-hidrogeles modificados y recubiertos. Para ello se opera en todos los casos del mismo modo. Se pesa una cantidad determinada del hidrogel encapsulado y se dispersa en 10 mL de PBS a pH fisiológico 7,4. Esos 10 mL que contienen el hidrogel dispersado se introducen en una membrana de diálisis de 25 mm y se dejan liberando con agitación en un vaso de precipitados con 130 mL de PBS a pH 7,4 a temperatura ambiente. Considerando que la liberación comienza en el momento en el que la membrana entra en contacto con los 130 mL de PBS exterior, en determinados tiempos se extrajeron 3 mL de la disolución externa para evaluar la concentración de molécula modelo en el dializado. Cabe destacar que tras cada muestreo se añadieron 3 mL de PBS a pH 7,4 para mantener el volumen de la disolución constante.

Las medidas en el espectrofotómetro se realizaron mediante barrido de 500 a 600 nm, mientras que las condiciones en el fluorímetro se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4: Condiciones de análisis del fluorímetro para el estudio de la liberación

Apertura rendija emisión (nm)	20
Apertura rendija excitación (nm)	20
$\lambda_{exc}$ (nm)	535
Rango de barrido (nm)	560-600

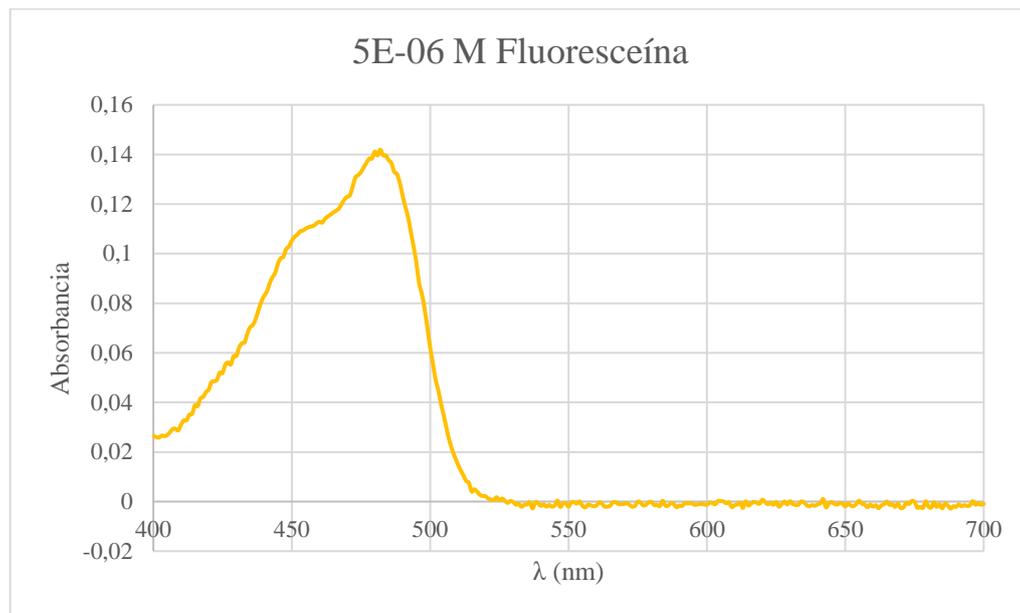
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

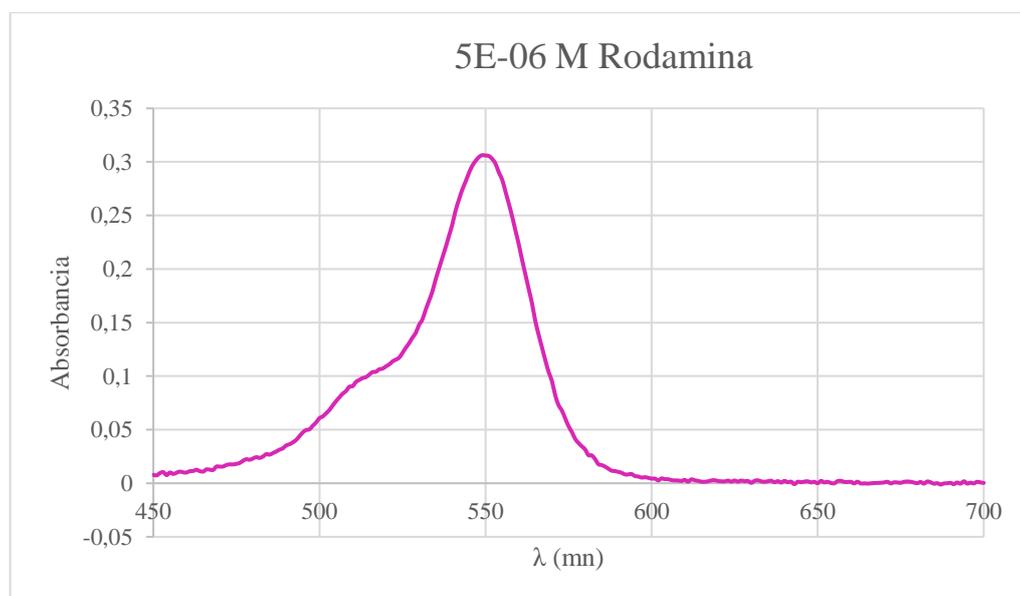
### 5.1 Caracterización de las moléculas modelo

#### 5.1.1 Determinación de las longitudes de onda de absorción

Como ya se comentó, se realizó un barrido en todo el rango del visible obteniéndose los siguientes espectros:



**Gráfica 1: Espectro de absorción de la fluoresceína**

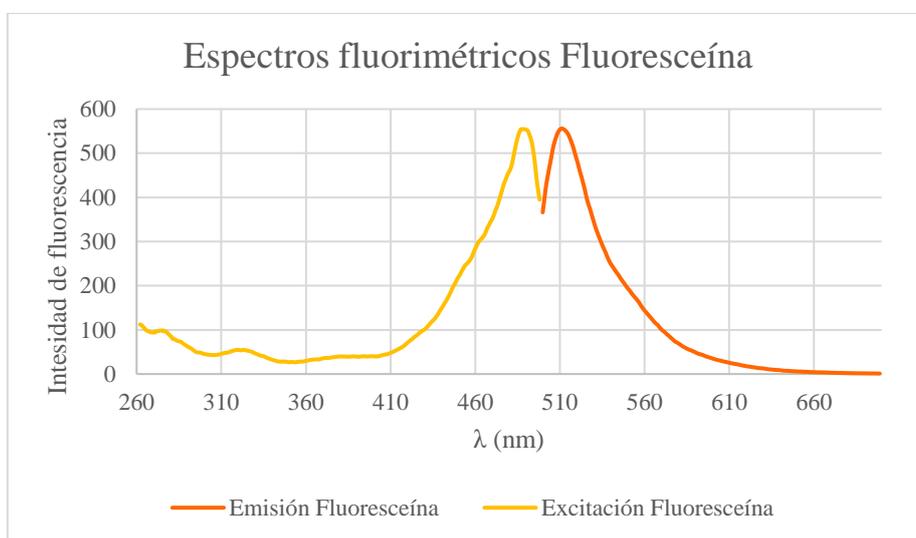


**Gráfica 2: Espectro de absorción de la rodamina**

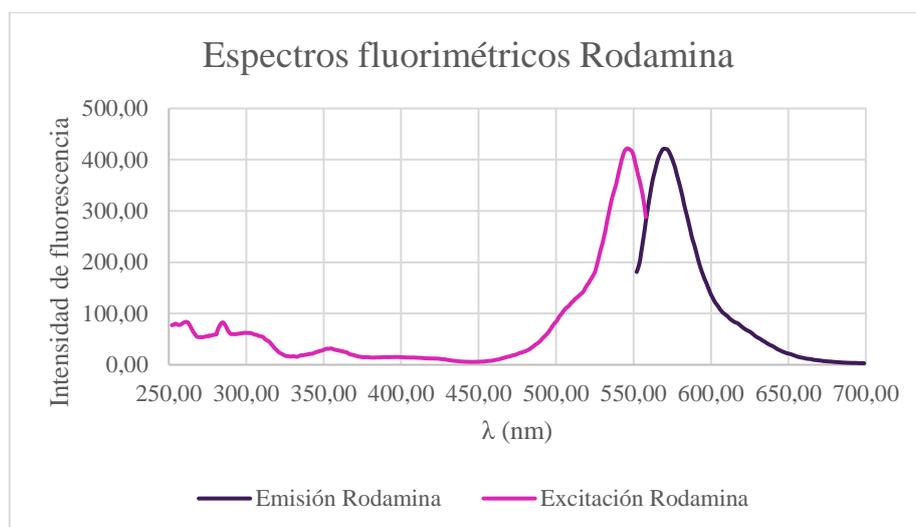
Como se observa, el máximo del pico de absorbancia para la fluoresceína se encuentra en 480 nm, mientras que para la rodamina está situado a 550 nm. Estos resultados tienen sentido, ya que el color de la disolución de la fluoresceína era amarillo, absorbiendo radiación correspondiente al azul (450-500 nm), y el de la rodamina púrpura- rosáceo, absorbiendo radiaciones correspondientes al verde (en torno a 550 nm).

### 5.1.2 Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.2 se adjuntan los espectros finales obtenidos en los que se observa el pico de emisión y excitación de las especies.



Gráfica 3: Espectros fluorimétricos de la fluoresceína



Gráfica 4: Espectros fluorimétricos de la rodamina

Se determinó que las longitudes de onda de excitación y emisión para cada fluoróforo fueron las que se muestran en la *Tabla 5*.

**Tabla 5: Longitudes de onda características para las moléculas modelo**

	<b>Fluoresceína</b>	<b>Rodamina</b>
$\lambda_{exc}$ (nm)	488	511
$\lambda_{em}$ (nm)	546	569

### 5.1.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia obtenido por el método directo de cada molécula modelo se recoge en la *Tabla 6*.

**Tabla 6: Rendimientos cuánticos obtenidos para las moléculas modelo**

<b>Rendimiento cuántico (%)</b>	
97,15	<b>Fluoresceína</b>
12,68	<b>Rodamina</b>

Como se observa, el valor de rendimiento cuántico de la fluoresceína es cercano al 100%. Es por esto que su uso como molécula marcadora está extendido, ya que los fotones que emite son mucho mayores que los que absorbe, lo cual se traduce en que la fuente puede ser poco intensa y la fluorescencia no se vería alterada. En el caso de la rodamina B este fenómeno no se observa.

### 5.1.4 Cálculo de los límites de detección de los métodos y del coeficiente de absorción molar

Como se explicó en el apartado 4.3.4, se realizaron calibrados de rodamina y fluoresceína con el fin de determinar sus límites de detección y coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ).

El LD se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3S_{ordenada}}{m}$$

Donde  $S_{ordenada}$  es la desviación estándar de la ordenada de la recta de calibrado y  $m$  la pendiente de esta.

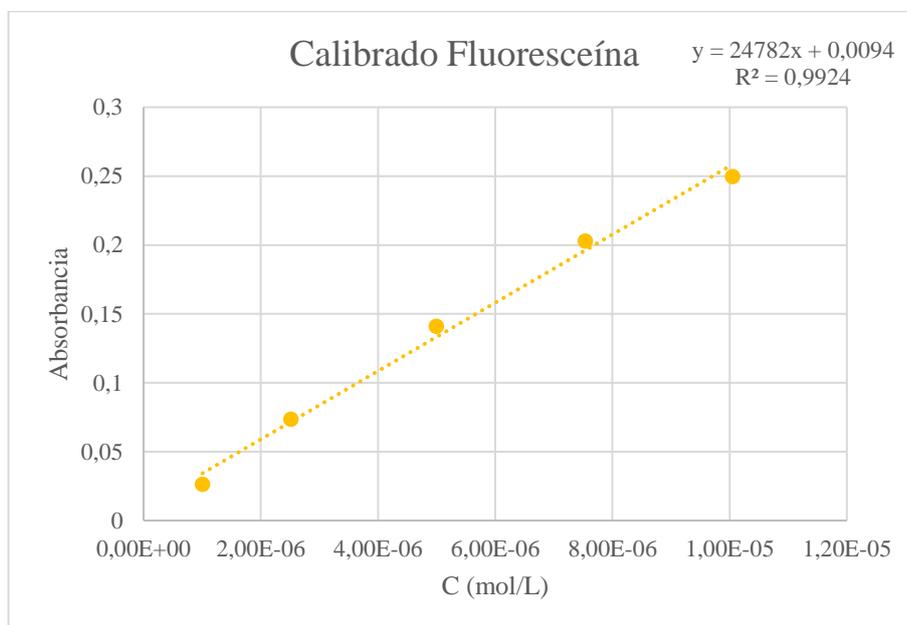
El coeficiente de absorptividad molar, por su parte, se halló gracias a la pendiente de la recta ya que  $\epsilon \cdot b$  se corresponde con la misma.

#### 5.1.4.1 Límite de detección espectrofotométrico y coeficiente de absorción molar

El calibrado y los resultados obtenidos para la fluoresceína y rodamina se muestran en las siguientes tablas y gráficas.

Tabla 7: Concentraciones empleadas para el calibrado de la fluoresceína en espectrofotometría

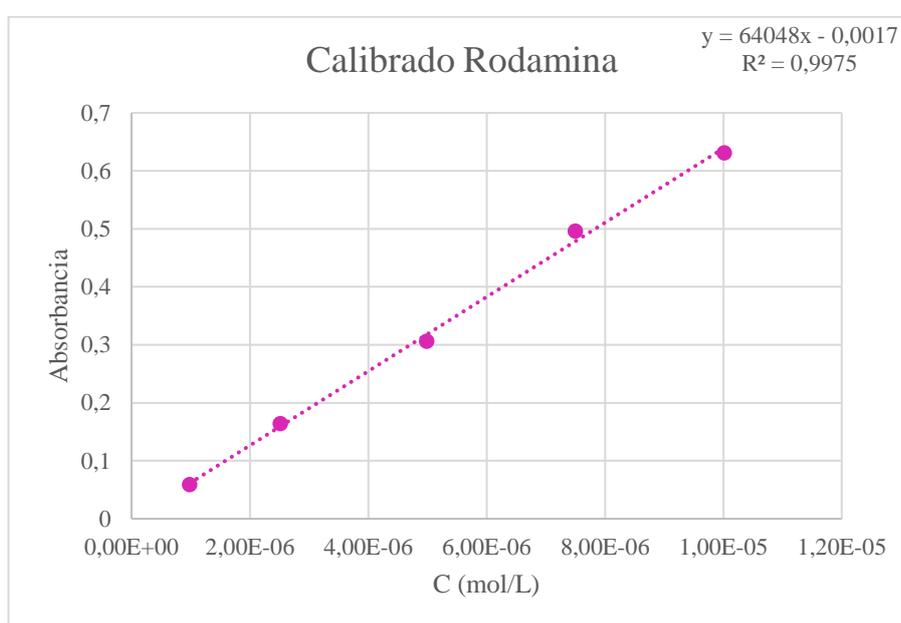
$\lambda=480,01$	
C (mol/L)	Abs
1,00E-06	0,026
2,51E-06	0,074
4,99E-06	0,14
7,54E-06	0,20
1,00E-05	0,25



Gráfica 5: Recta de calibrado espectrofotométrica de la espectrofotométrica

Tabla 8: Concentraciones empleadas para el calibrado de la rodamina en espectrofotometría

$\lambda=550,00$	
C (mol/L)	Abs
9,80E-07	0,059
2,51E-06	0,16
4,98E-06	0,31
7,50E-06	0,50
1,00E-05	0,63



Gráfica 6: Recta de calibrado espectrofotométrica de la rodamina

Tabla 9: Límites de detección en el método espectrofotométrico y coeficientes de absorción molar

	Rodamina	Fluoresceína
LD (mol/L)	5,31E-07	9,35E-07
$\epsilon$ (L/mol·cm)	64047,58	24781,88

Comparando los límites de detección de ambas especies, recogidos en la *Tabla 9*, se aprecia que el de la fluoresceína es ligeramente superior y el coeficiente de absorción molar es menor, lo cual no concuerda con los rendimientos cuánticos obtenidos. Sin embargo, el LD no solo depende de la especie medida, sino también del equipo utilizado, por lo que el espectrofotómetro UV-VIS podría ser más sensible para la rodamina que

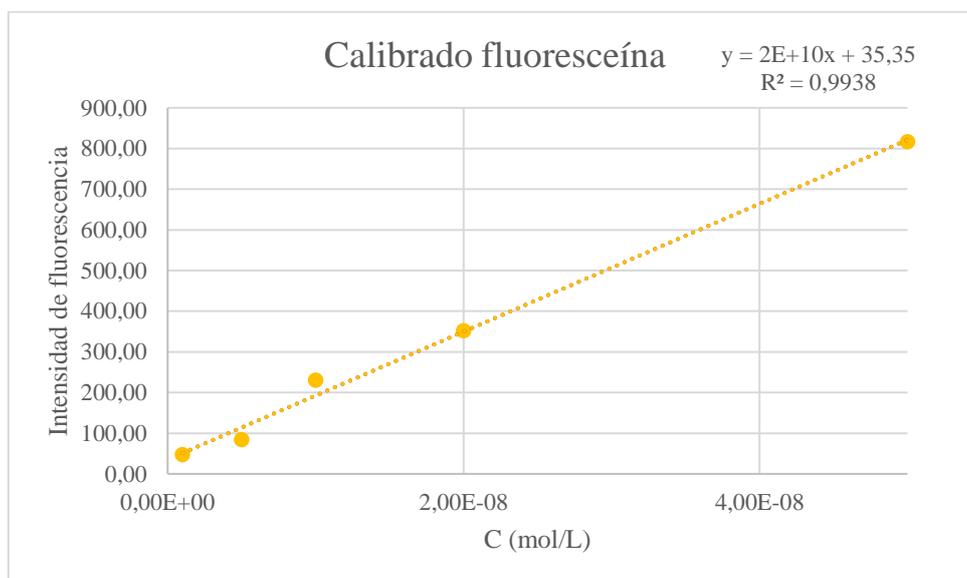
para la fluoresceína, ya que además la diferencia de los límites de detección no es muy grande.

#### 5.4.1.2 Límite de detección fluorimétrico

A continuación, se muestran las rectas de calibrado obtenidas para ambas especies mediante las cuales se determinó el límite de detección de las mismas.

**Tabla 10: Concentraciones empleadas para el calibrado de la fluoresceína en fluorimetría**

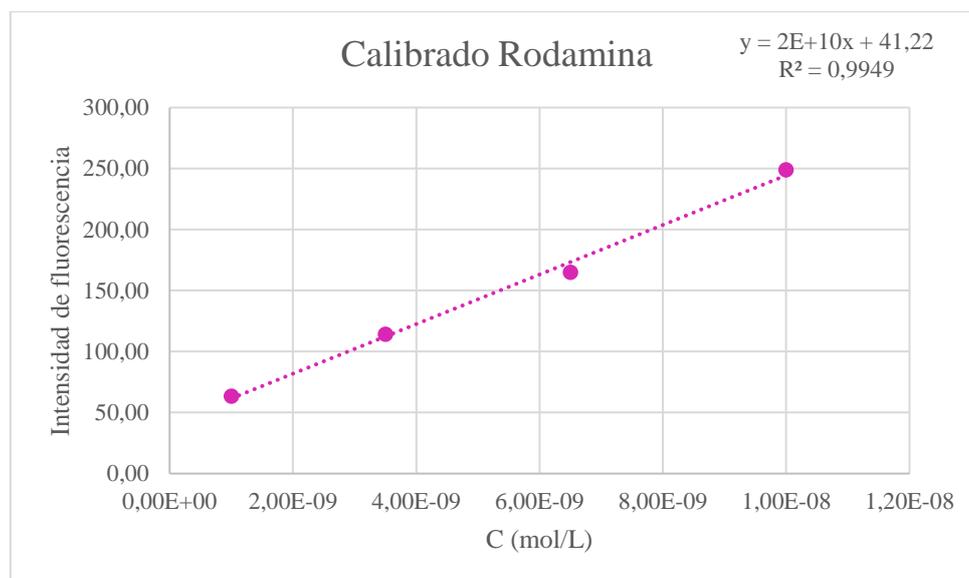
$\lambda=511,94$	
C (mol/L)	Intensidad de fluorescencia
5,00E-08	816,07
2,00E-08	351,33
1,00E-08	230,26
5,00E-09	83,97
1,00E-09	46,76



**Gráfica 7: Recta de calibrado fluorimétrica de la fluoresceína**

**Tabla 11: Concentraciones empleadas para el calibrado de la rodamina en fluorimetría**

$\lambda=565,97$	
C (mol/L)	Intensidad de fluorescencia
1,00E-08	248,89
6,50E-09	165,03
3,50E-09	114,28
1,00E-09	63,34



**Gráfica 8: Recta de calibrado fluorimétrica de la rodamina**

**Tabla 12: Límites de detección en el método fluorimétrico**

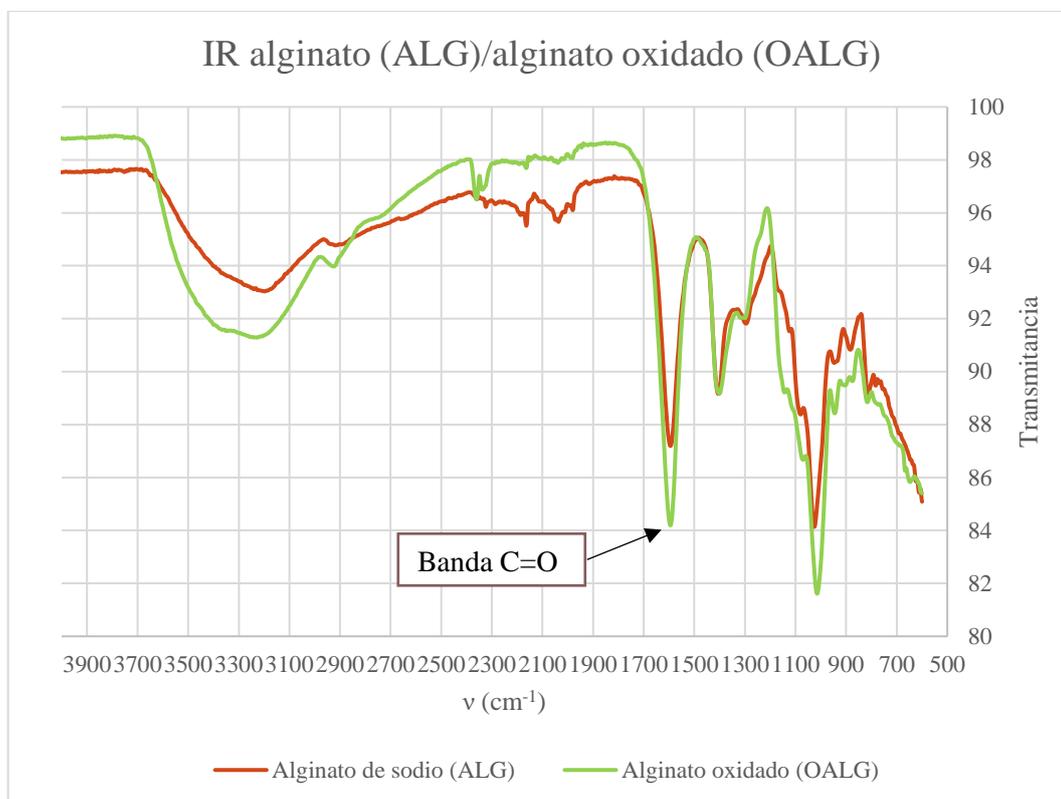
	Rodamina	Fluoresceína
LD (mol/L)	9,45E-10	3,36E-09

Al igual que en el espectrofotómetro, la rodamina posee un límite de detección menor que la fluoresceína, lo cual no concuerda con lo esperado por los valores de rendimientos cuánticos. Sin embargo, como ya se ha dicho, el límite de detección depende del equipo de medida, por lo que podría ser este más sensible en las longitudes de onda de emisión de la rodamina que en las de la fluoresceína.

## 5.2 Caracterización de los nano-hidrogeles

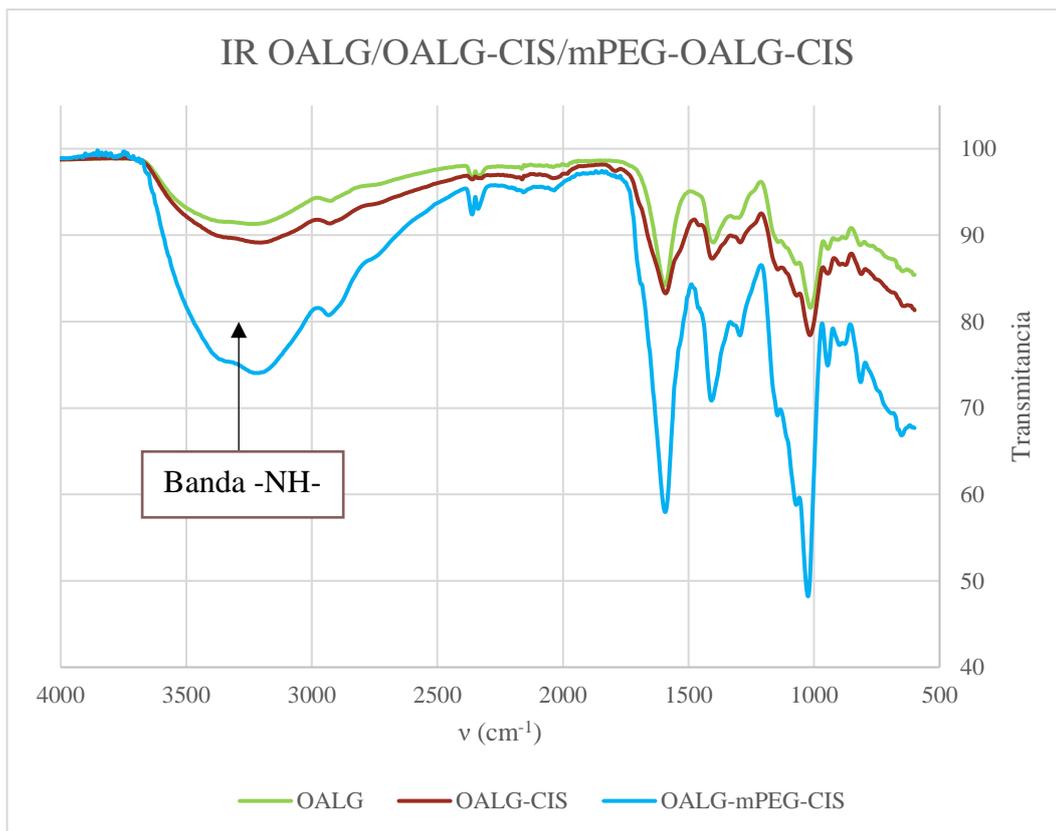
### 5.2.1 FTIR

Con el fin de comprobar que los productos de las reacciones fueron los deseados se realizan espectros de infrarrojo. Los resultados se muestran en las siguientes gráficas.



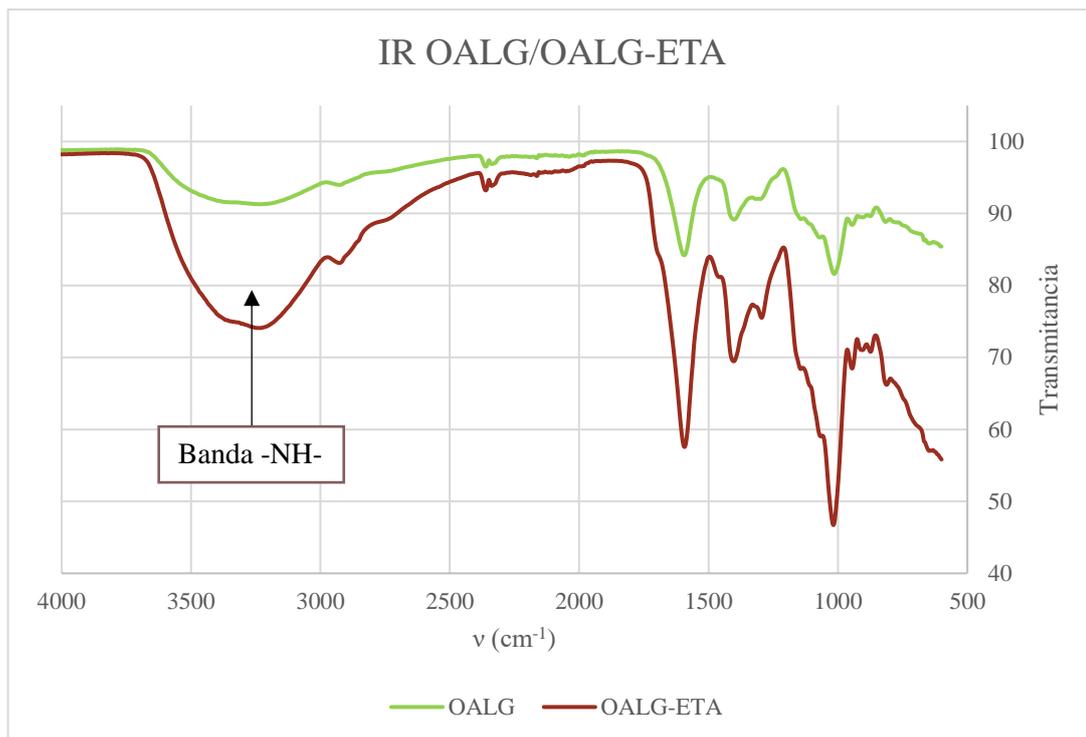
Gráfica 9: Espectro de IR del alginato de sodio y el producto de síntesis de su oxidación (OALG)

La oxidación del alginato se justifica con el aumento de la banda de estiramiento simétrico del enlace C=O a  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , ya que, al oxidarse, los alcoholes secundarios presentes en la molécula se transforman en grupos carbonilo que participan en esa vibración del enlace y hacen que la banda aumente su intensidad.<sup>27,28</sup>



**Gráfica 10: Espectros de IR del OALG y los productos de las modificaciones con cistamina (OALG-CIS) y del recubrimiento y posterior modificación con cistamina (OALG-mPEG-CIS)**

Como se observa en el espectro, la banda correspondiente al estiramiento de los enlaces -NH- de la unión amida ( $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ) aumenta en los casos de los hidrogeles de ALG-CIS, lo cual demuestra que la cistamina se ha entrecruzado con el alginato dando lugar a la formación de enlace amida. Cabe destacar que en el caso del hidrogel recubierto y modificado con cistamina (OALG-mPEG-CIS) el pico es más intenso. Esto concuerda con lo esperado, dado que la presencia de mPEG-NH<sub>2</sub> en el gel se traduce en un mayor número de enlaces tipo amida, los correspondientes a OALG-mPEG y OALG-CIS (ver *Ilustración 14*).<sup>27,28</sup>



Gráfica 11: Espectros de IR del OALG y el producto de reacción de la síntesis del entrecruzamiento de etilendiamina con el hidrogel de alginato

En este caso ocurre lo mismo, la banda correspondiente al estiramiento de los enlaces -NH- aumenta, por lo que se demuestra que la etilendiamina se ha entrecruzado con el alginato.<sup>27,28</sup>

### 5.2.2 DLS

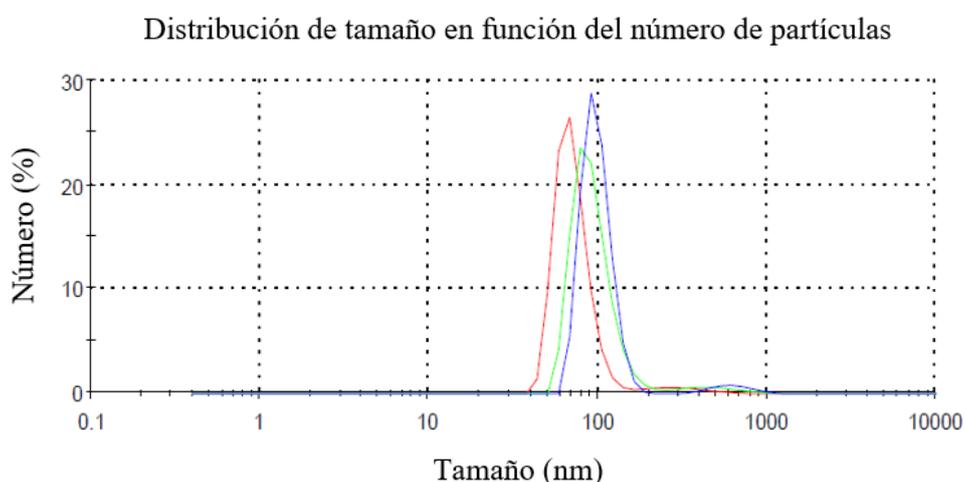
Las muestras para la caracterización por DLS se presentaron dispersas en agua MilliQ, y los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 13*.

Tabla 13: Radio hidrodinámico de los distintos tipos de hidrogeles

Tipo de hidrogel	OALG-ETA	OALG-CIS	Encapsulación de rodamina en OALG-ETA	Encapsulación de rodamina en OALG-CIS
Radio hidrodinámico (nm)	864,0	783,1	557,4	377,0
PdI	0,667	0,612	0,563	0,411

Como se puede apreciar, los valores de radios hidrodinámicos varían mucho de los hidrogeles sin encapsular entre ellos, y cuando se encuentran encapsulando la molécula modelo. Esta diferencia de tamaño entre los encapsulados y libres puede deberse a que en presencia del fluoróforo la capacidad de hinchamiento disminuye y por tanto su radio hidrodinámico también.

Un parámetro importante a evaluar es el parámetro PDI, que indica la polidispersión de las partículas en suspensión. Cuanto más cercano a 1 sea, menor índice de polidispersión tendrá la partícula. En este caso, los valores obtenidos no son cercanos al valor ideal, lo que indica que los hidrogeles son muy polidispersos. A modo de ejemplo, se presenta a continuación la distribución de tamaño en función del número de partículas con ese tamaño del hidrogel OALG-ETA con rodamina encapsulada.



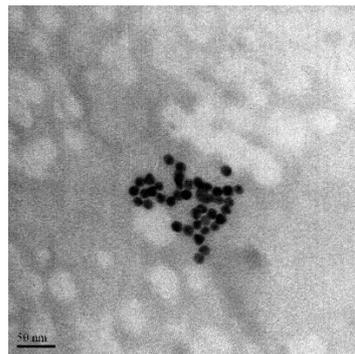
**Gráfica 12: Distribución de tamaño en función del número de partículas con ese tamaño del hidrogel OALG-ETA con rodamina encapsulada**

Cada pico de la gráfica corresponde a una medida de la muestra, ya que se realizan 3 medidas y se promedian. Como se puede ver, se justifica que la polidispersión de las partículas es grande debido a su distribución de manera desigual desde los 60 nm hasta los 300 nm aproximadamente.

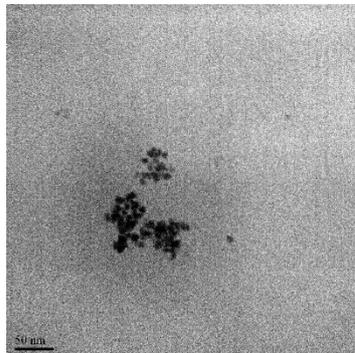
### 5.2.3 TEM

Los hidrogeles se caracterizaron también por microscopía de transmisión electrónica operando a su aumento máximo, x300000.

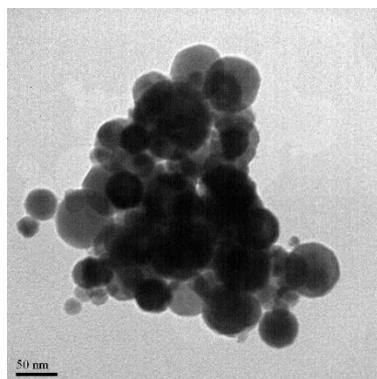
El tamaño de partícula para todos los hidrogeles, tanto los encapsulados como los que se encontraban sin encapsular y los que fueron recubiertos, fue menor a 50 nm, por lo que la terminología de nano-hidrogel es correcta. Las figuras 16 a 18 recogen algunas de las imágenes obtenidas por TEM para los distintos hidrogeles.



**Ilustración 16: Imagen del TEM de los hidrogeles OALG-CIS**



**Ilustración 17: Imagen del TEM de los hidrogeles OALG-ETA encapsulando rodamina**



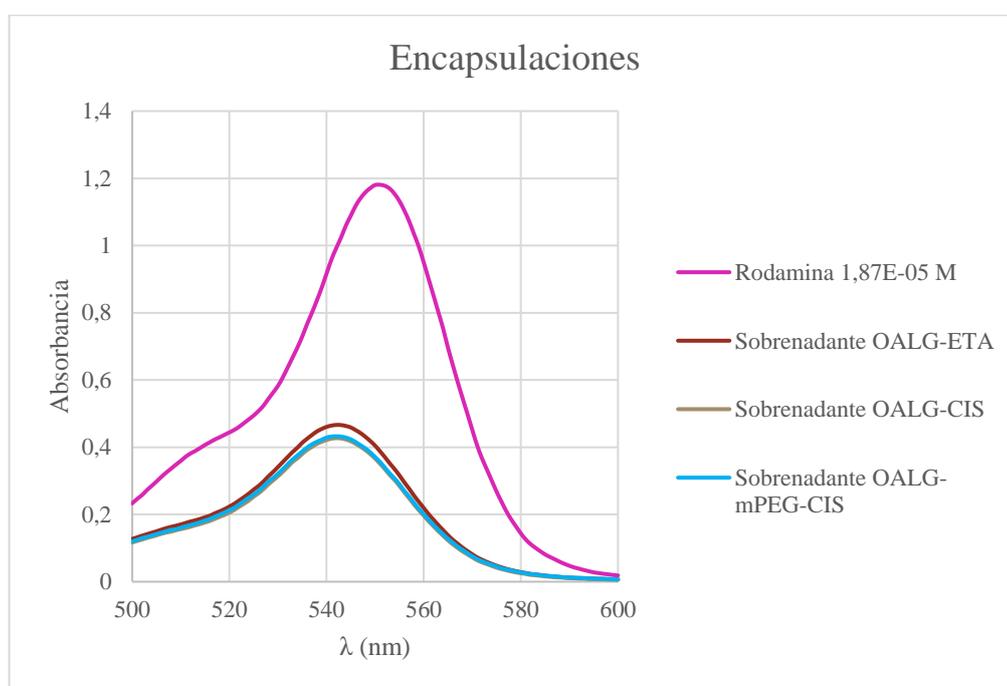
**Ilustración 18: Imagen TEM de los hidrogeles OALG-mPEG-CIS**

Se puede apreciar una gran diferencia entre los diámetros obtenidos por esta técnica con respecto a los obtenidos por DLS. Dicha diferencia se debe al hinchamiento de los hidrogeles en disolución y a que el DLS mide el diámetro hidrodinámico que, en principio, es superior al de la partícula seca, tal como se aprecia en TEM.

### 5.3 Estudio comparativo de la capacidad de liberación y encapsulación de los nano-hidrogeles

#### 5.3.1 Ensayos de encapsulación

La encapsulación de la rodamina se siguió mediante espectrofotometría tal como se describe en el apartado 4.4.4.



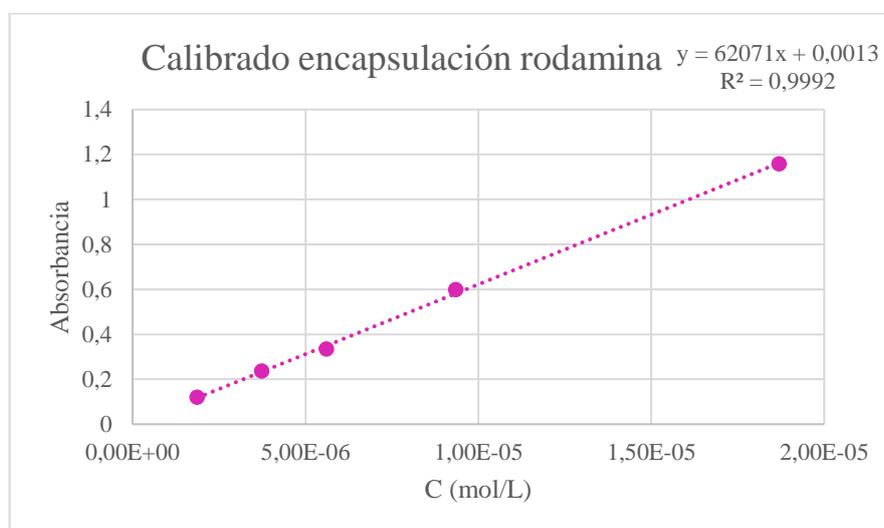
Gráfica 13: Espectros de absorción de la rodamina de partida y del sobrenadante tras las encapsulaciones

Como se aprecia, existe una disminución de la absorbancia de los sobrenadantes de las encapsulaciones con respecto a la disolución de rodamina inicial, por lo que se confirma que la rodamina está encapsulada en el nano-hidrogel.

Para determinar de manera aproximada la cantidad de rodamina encapsulada se realizó un calibrado de la molécula modelo. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 14: Concentraciones empleadas en el calibrado de la rodamina para determinar la encapsulación de esta en los hidrogeles

$\lambda=548,00$	
C (mol/L)	Abs
1,87E-05	1,16
1,87E-06	0,12
3,74E-06	0,24
5,61E-06	0,33
9,35E-06	0,60



Gráfica 14: Recta de calibrado de la encapsulación de rodamina

Tabla 15: Rodamina encapsulada por cada nano-hidrogel

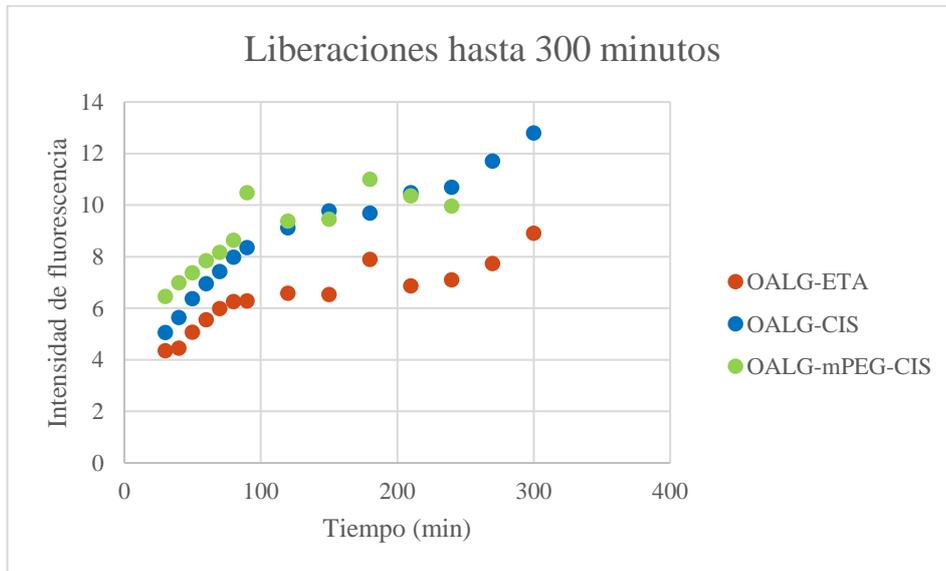
Nano-hidrogel	Abs	C <sub>sobrenadante</sub> (mol/L)	C <sub>real</sub> (mol/L)	C <sub>encapsulado</sub> (mol/L)	Encapsulado (mol rod/ g gel)
<b>OALG-ETA</b>	0,43	6,92E-06	6,92E-04	1,17E-03	5,53E-04
<b>OALG-CIS</b>	0,39	6,29E-06	6,29E-04	1,24E-03	5,24E-04
<b>OALG-mPEG-CIS</b>	0,40	6,37E-06	6,37E-04	1,23E-03	2,56E-03

Los valores obtenidos de encapsulado son muy similares, siendo los más altos para los nano-hidrogeles OALG-mPEG-CIS, por lo que se podría pensar que la presencia de la cadena recubridora (mPEG-NH<sub>2</sub>) facilita la encapsulación. Este hecho podría deberse

a las posibles interacciones de enlace de hidrógeno y electrostáticas entre la rodamina y la cadena recubridora sumadas a la encapsulación por sí misma, que se debe a reacciones base de Schiff entre los grupos amino de la rodamina y los grupos aldehído del OALG.<sup>16</sup>

### 5.3.2 Seguimiento de la liberación mediante espectrofluorimetría

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo tal como se indica en el apartado 4.6. Se evaluó la capacidad de liberación en función del tiempo mediante medidas fluorimétricas. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas siguientes.



**Gráfica 15: Liberaciones de los nano-hidrogeles en función del tiempo. Las primeras medidas de realizaron cada 10 minutos y las últimas cada 30 minutos**



**Gráfica 16: Liberaciones de en función del tiempo a las 24, 48 y 72 horas**

Como se aprecia en las gráficas, en todos los ensayos existe liberación al pH fisiológico, ya que en los primeros minutos la intensidad de fluorescencia de la disolución exterior aumenta, indicando de que hay rodamina dializando al exterior y por tanto liberándose del encapsulado. También se observa que, en el caso del hidrogel OALG-mPEG-CIS, la señal comienza a disminuir a partir de los 180 minutos, sugiriendo la liberación completa de la rodamina. Lo mismo ocurre con el gel OALG-ETA y OALG-CIS a partir de las 24 horas.

## 6. CONCLUSIONES

---

- ❖ Se han sintetizado nano-hidrogeles de alginato modificados con cistamina y etilendiamina, cuya estructura se ha confirmado mediante FTIR
- ❖ La encapsulación de las moléculas modelo fue exitosa al pH de síntesis solamente en el caso de la rodamina, siendo el mejor encapsulador el hidrogel de cistamina recubierto (OALG-mPEG-CIS)
- ❖ Con los tres tipos de nano-hidrogeles de alginato modificados se consigue la liberación de la molécula modelo
- ❖ La liberación más rápida (3 horas) sucede con el hidrogel de alginato modificado con cistamina y recubierto con mPEG-NH<sub>2</sub> (OALG-mPEG-CIS)

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- (1) Organización Mundial de la salud. Comité de Expertos de La OMS En Farmacodependencia. Ginebra 1969.
- (2) Maria del Carmen Avendaño Lopez. *Introducción a La Química Farmaceutica* , 2nd ed.; McGrawHill/Interamericana de España: Madrid, 1993.
- (3) Li, Y.; Maciel, D.; Rodrigues, J.; Shi, X.; Tomás, H. Biodegradable Polymer Nanogels for Drug/Nucleic Acid Delivery. *Chemical Reviews*. American Chemical Society August 26, 2015, pp 8564–8608. <https://doi.org/10.1021/cr500131f>.
- (4) Barros, H.; Patricia, A.; Morantes, A.; Teresa, M.; Hoyos, C.; Ignacio, M.; Ospino, M.; José, L. Preparación de Nanopartículas de Quitosano Modificadas Con Alginato de Sodio Con Potencial Para La Liberación Controlada de Medicamentos. *Revista EIA* **2016**, 3, 75–83. <https://doi.org/10.14508/reia.2016.12.e3.75-83>.
- (5) Yang, J.; Han, S.; Zheng, H.; Dong, H.; Liu, J. Preparation and Application of Micro/Nanoparticles Based on Natural Polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier June 5, 2015, pp 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.029>.
- (6) Jain, K. K. Current Status and Future Prospects of Drug Delivery Systems. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2014; Vol. 1141, pp 1–56. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0363-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0363-4_1).
- (7) Domínguez, P. *Nuevas Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada: Revisión y Relevancia*.
- (8) Chaubet, F.; Rodriguez-Ruiz, V.; Boissière, M.; Velasquez, D. Pharmacology: Drug Delivery. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering*; 2019; Vol. 1–3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11007-4>.
- (9) Vashist, A.; Vashist, A.; Gupta, Y. K.; Ahmad, S. Recent Advances in Hydrogel Based Drug Delivery Systems for the Human Body. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, 2 (2), 147–166. <https://doi.org/10.1039/c3tb21016b>.
- (10) Mithilesh, K.; Jha, I. Modified Release Formulations to Achieve the Quality Target Product Profile (QTPP). **2012**, 3 (8), 8.

- (11) Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada y Estereoisómeros. *Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra* **2005**, 13 (1).
- (12) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd 2012, pp 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- (13) Ruvinov, E.; Cohen, S. Alginate Biomaterial for the Treatment of Myocardial Infarction: Progress, Translational Strategies, and Clinical Outlook. From Ocean Algae to Patient Bedside. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V. January 15, 2016, pp 54–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.021>.
- (14) Pawar, S. N.; Edgar, K. J. Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, Properties and Applications. *Biomaterials*. April 2012, pp 3279–3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>.
- (15) Hay, I. D.; Rehman, Z. U.; Moradali, M. F.; Wang, Y.; Rehm, B. H. A. Microbial Alginate Production, Modification and Its Applications. *Microbial Biotechnology*. November 2013, pp 637–650. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>.
- (16) Zhou, T.; Jia, X.; Zhao, X.; Li, J.; Liu, P. Facile Preparation of PH/Reduction Dual-Responsive Prodrug Nanohydrogels for Tumor-Specific Intracellular Triggered Release with Enhanced Anticancer Efficiency. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, 5 (15), 2840–2848. <https://doi.org/10.1039/c7tb00433h>.
- (17) Lin, C. C.; Metters, A. T. Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*. November 30, 2006, pp 1379–1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>.
- (18) Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials*. June 6, 2006, pp 1345–1360. <https://doi.org/10.1002/adma.200501612>.
- (19) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. *Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis*; 2004; Vol. 377.

- (20) *Espectro electromagnético*.  
[https://es.wikipedia.org/wiki/Espectro\\_electromagn%C3%A9tico](https://es.wikipedia.org/wiki/Espectro_electromagn%C3%A9tico) (accessed 2022-06-20).
- (21) *ENTENDIENDO LA ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS*.  
<https://comintec.com.mx/infomail/mailling45.php> (accessed 2022-07-02).
- (22) *Fluorescencia*. <https://theory.labster.com/fluorescence-es/> (accessed 2022-07-02).
- (23) Tellería Barcia, O. *Sistemas Dispensadores de Medicamentos Para La Liberación Controlada de Antibióticos*, 2019.
- (24) *Dispersión de luz dinámica: definición de términos comunes*.  
<https://www.gualab.com.ar/notas-tecnicas/dls/> (accessed 2022-06-15).
- (25) *DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)*. <https://www.fritsch.es/medicion-de-particulas/conocimientos-de-fritsch/dispersion-de-luz-dinamica/> (accessed 2022-06-23).
- (26) *¿Qué es el Microscopio Electrónico de Transmisión?*  
<https://modeloatomicode.com/actual/que-es-el-microscopio-electronico-de-transmision/> (accessed 2022-06-24).
- (27) Field L.D.; Sternhell S.; Kalman J.R. *Organic Structures from Spectra*, Fourth Edition.; Wiley John and Sons Ltd, Ed.; 2008.
- (28) Pretsch, E.; Bühlmann, P. (Philippe); Affolter, C. (Christian). *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data.*; Springer, 2000.