



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Sistemas dispensadores de medicamentos para
la liberación controlada de antibióticos**

Olga Tellería Barcia

Oviedo, julio 2019

Índice

RESUMEN	1
I. Introducción.....	2
1. Fármacos: los antibióticos	2
1.1. Antibióticos β -lactámicos	3
1.1.1. Marco histórico	3
1.1.2. Clasificación y características	3
1.1.3. Mecanismo de acción	4
1.1.4. Aspectos farmacocinéticos	4
1.1.5. Efectos adversos.....	5
1.2. Nafcilina	5
2. Sistemas dispensadores de medicamentos	6
3. Polímeros de impresión molecular	9
3.1. Proceso sol-gel: xerogeles	10
3.1.1. Síntesis.....	10
3.1.2. Características de los xerogeles	11
4. Métodos ópticos.....	11
4.1. Instrumentación óptica	13
4.2. Espectrometría por absorción ultravioleta-visible	13
4.3. Espectrometría de fotoluminiscencia	15
4.4. Espectrometría infrarroja	17
II. Objetivos	19
III. Parte experimental	20
1. Materiales y reactivos	20
1.1. Material.....	20
1.2. Reactivos.....	20
2. Instrumentación	21
3. Disoluciones y metodología	21
3.1. Preparación de disoluciones.....	21
3.2. Preparación de medios biológicos sintéticos	22
3.2.1. Medio intestinal.....	22
3.2.2. Medio gástrico.....	22
3.3. Protocolos de medida	22
4. Síntesis y lavados de los materiales.....	23

5.	Caracterización espectroscópica.....	24
5.1.	Espectrometría UV-vis	24
5.1.1.	Espectrometría UV-vis en agua	24
5.1.2.	Espectrometría UV-vis en metanol	25
5.2.	Fluorescencia molecular	26
5.2.1.	Fluorescencia molecular en agua	26
5.2.2.	Fluorescencia molecular en etanol	28
5.2.3.	Fluorescencia en medio gástrico	29
5.3.	Fosforescencia a temperatura ambiente (RTP)	31
6.	Caracterización de los nanomateriales	32
6.1.	TEM.....	32
6.2.	FT-IR	32
IV.	Discusión y resultados	33
1.	Caracterización de los materiales.	33
1.1.	TEM.....	33
1.2.	FTIR	36
2.	Experimentos de liberación de nafcilina	38
2.1.	Medio intestinal.....	38
2.2.	Medio gástrico.....	40
2.2.1.	Tubos con 250 mg de compuesto.....	40
2.2.2.	Tubos con 500 mg de compuesto.....	41
2.2.3.	Ensayos de liberación por agitación magnética	42
V.	Conclusiones	44
VI.	Bibliografía.....	45
ANEXO	49
1.	Estructura precursores.....	49

RESUMEN

En los últimos años, se han realizado una serie de avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para optimizar la administración de medicamentos. Para maximizar la eficacia y seguridad de los medicamentos, los sistemas de administración de fármacos deben ser capaces de regular la velocidad de liberación y/o dirigir el medicamento a un sitio específico.

Algunas de las sustancias que pueden desenvolver este objetivo son los liposomas, los niosomas, las enzimas o los polímeros de impresión molecular. Estos últimos son los usados en este trabajo, su capacidad de reconocimiento específica y liberación controlada los hace apropiados.

En este trabajo se sintetizan y caracterizan nanopartículas de sílice con impresión molecular superficial empleando nafcilina como molécula molde y diversos precursores silanos orgánicamente modificados, para estudiar las propiedades de liberación del antibiótico en presencia de medios biológicos artificiales como son el medio gástrico y el intestinal. Paralelamente, se sintetizan y caracterizan nanomateriales idénticos, pero en ausencia de nafcilina para utilizarlos como control.

Para poder controlar la cantidad de fármaco retenido durante el proceso y liberado en los distintos medios, se ponen a punto diferentes metodologías basadas en fluorescencia molecular, fosforescencia molecular a temperatura ambiente y absorción visible-ultravioleta.

I. Introducción

1. Fármacos: los antibióticos

Un fármaco, o principio activo, se define como 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 [1].

La asociación de los fármacos con todos aquellos componentes necesarios para proporcionar una forma de dosificación adecuada da lugar al medicamento. Cuando un fármaco tiene una actividad biológica útil desde el punto de vista terapéutico, se desarrolla hasta dar lugar a un medicamento, lo que supone que se presenta como una “forma farmacéutica” (inyectables, comprimidos, etc.), constituida por uno o varios principios activos y, generalmente, por uno o varios excipientes [1].

Los fármacos se pueden clasificar atendiendo a diferentes características:

- En función de si son estructuralmente inespecíficos o específicos. Es decir, si su función está relacionada directamente con su estructura o no.
- De acuerdo con la acción terapéutica de los fármacos sobre los órganos o si causan efectos idénticos. Esta clasificación se estructura, a su vez, sobre subdivisiones basadas en similitudes estructurales de sus componentes. Por ejemplo, dentro de los antibióticos se han establecido grupos estructuralmente relacionados, como los β -lactámicos.
- Distinguiendo entre agentes quimioterápicos y farmacodinámicos. Los primeros actúan frente a microorganismos y parásitos, alterando su ciclo vital por interacción con sus procesos bioquímicos. Los segundos, modulan las funciones fisiológicas [2].

En este trabajo, el fármaco a estudiar es un antibiótico, sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Un agente antimicrobiano debe cumplir, por lo menos: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped. Su origen puede ser:

- Natural o biológico. Si se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.
- Semisintético. Si se obtiene a partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, modificando algunas de sus características químicas para conseguir una mejoría en alguna propiedad de interés.

Los antibióticos, que desempeñan una actividad antiinfecciosa, realizan una acción etiológica que busca la eliminación de un organismo infectante sin que, en la medida de lo posible, se lesionen las células infectadas. Así, los antibióticos están definidos por su espectro antimicrobiano, es decir, el conjunto de agentes patógenos que son afectados por las concentraciones del antibiótico que se pueden alcanzar sin causar toxicidad.

Los agentes antimicrobianos se comportan de diversas maneras [3]:

- Como bactericidas: Producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso.
- Como bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse.

Que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y, por lo tanto, de su estructura, pero contribuyen también otros factores, tanto del germen como del antibiótico: concentración alcanzada en el sitio de infección, tipo de germen, tamaño del inóculo, tiempo de acción y fase de crecimiento de la bacteria.

Actualmente, existen tres categorías de antimicrobianos atendiendo a la relación entre actividad antibacteriana y concentración alcanzada por el antibiótico en el lugar de la infección:

- Los que producen una acción bactericida poco relacionada con la concentración.
- Los que poseen actividad bactericida concentración-dependiente.
- Los que se comportan como bacteriostáticos.

1.1. Antibióticos β -lactámicos

1.1.1. Marco histórico

En 1928, el científico Alexander Fleming, que trabajaba en el Hospital St Mary's de Londres, observó que una placa de cultivo en la que se cultivaban estafilococos, se había contaminado con un hongo del género *Penicillium* y que el crecimiento bacteriano se había inhibido en las proximidades del hongo. Aisló el hongo en un cultivo puro y demostró que producía una sustancia bacteriana, que denominó penicilina. Posteriormente, en 1949, Florey, Chain y colaboradores en Oxford, extrajeron esta sustancia y analizaron sus efectos antibacterianos. Demostraron que tenía propiedades quimioterápicas potentes en ratones infectados y que no era tóxica, con lo que se iniciaba "la era de los antibióticos".

1.1.2. Clasificación y características

Los antibióticos β -lactámicos presentan como característica común la presencia de un anillo β -lactámico asociado a otro tiazolidínico de cinco componentes, lo que da origen al núcleo responsable de su actividad biológica, el ácido 6-aminopenicilánico. Dentro de esta familia de antibióticos se agrupan las penicilinas, *Figura 1 (a)*, y las cefalosporinas, *Figura 1 (b)*:

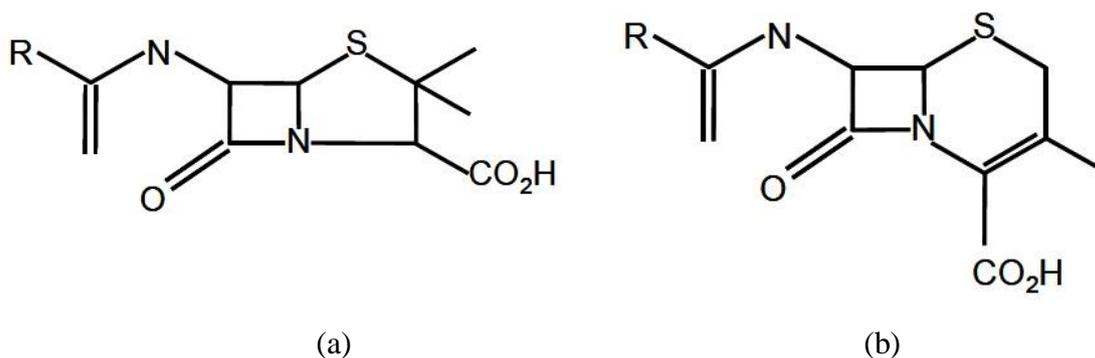


Figura 1: Estructura general de los antibióticos β -lactámicos: (a) penicilinas y (b) cefalosporinas.

Otros β -lactámicos, obtenidos más recientemente, son los monobactámicos y carbapenemes, de uso menos frecuente y con estructuras diferentes. Las monobactamas son antibióticos que solamente poseen el grupo β -lactámico y son activos frente a bacterias gram negativas [4] mientras que los carbapenemes son antibióticos β -lactámicos dotados de mayor espectro de actividad y resistencia a las β -lactamasas [5].

Aunque las penicilinas son muy eficaces y se usan de forma generalizada, pueden ser destruidas por las amidasas y β -lactamasas bacterianas. Esto constituye la base de uno de los principales tipos de resistencia a los antibióticos.

1.1.3. Mecanismo de acción

Todos los antibióticos β -lactámicos interfieren en la síntesis del peptidoglucano, que es un polímero esencial de la pared celular bacteriana. Después de unirse a las proteínas de unión a la penicilina de la bacteria, inhiben la enzima de transpeptidación que establece puentes cruzados entre las cadenas peptídicas que están unidas al esqueleto de peptidoglucano.

Así, se produce la inactivación de un inhibidor de las enzimas autolíticas de la pared celular, lo que da lugar a la lisis de la bacteria.

1.1.4. Aspectos farmacocinéticos

La absorción oral de las penicilinas puede variar dependiendo de su estabilidad en el medio ácido y de su adsorción a los alimentos en el intestino. También pueden administrarse por inyección intravenosa e intramuscular.

Las penicilinas se distribuyen de manera generalizada en los líquidos corporales y pasan a las articulaciones, las cavidades pleural y pericárdica, la bilis, la saliva y la leche, y atraviesan la

placenta. Al ser insolubles en lípidos, no entran en las células de mamíferos y solo atraviesan la barrera hematoencefálica si las meninges están inflamadas.

La eliminación de la mayoría de las penicilinas es principalmente renal y tiene lugar rápidamente, el 90% mediante secreción tubular.

1.1.5. Efectos adversos

Las penicilinas están relativamente exentas de efectos tóxicos directos. Los principales efectos adversos son las reacciones de hipersensibilidad, causados por productos de degradación de la penicilina, que se combinan con las proteínas del huésped y se hacen antigénicos.

También se puede dar la erupción cutánea, fiebre, y alteración de la flora bacteriana intestinal, sobre todo en las penicilinas de amplio espectro aplicadas por vía oral [6].

1.2. Nafcilina

La nafcilina, *Figura 2*, es una penicilina semisintética resistente a la penicilinasasa, ya que posee una cadena lateral de acilo voluminosa que inhibe estéricamente la acción de la enzima al prevenir la apertura del anillo β -lactámico. Se administra por vía intramuscular o intravenosa para el tratamiento de bacterias Gram Positivas, especialmente estafilococos, que suelen ser resistentes a otras penicilinas [7].

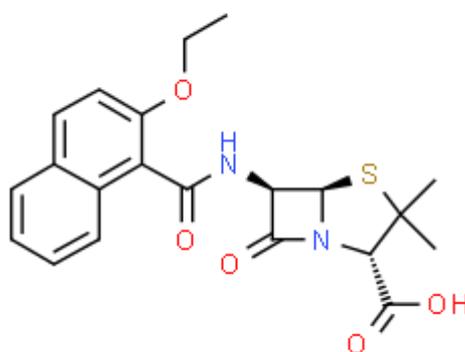


Figura 2. Estructura química de la nafcilina.

La nafcilina es resistente a la inactivación por la mayoría de las penicilinasas estafilocócicas y es activa contra muchas cepas productoras de penicilinasasa de *Staphylococcus aureus* y

Staphylococcus epidermidis que son resistentes a otras penicilinas. También, una variedad de estreptococos se inhibe por la nafcilina, como los *Streptococcus pneumoniae*. En cambio, los *enterococcus* son, generalmente, resistentes a la nafcilina. Además, se ha descrito sinergia con la ampicilina contra cepas *Haemophilus influenzae* β -lactamasa-negativas resistentes a la ampicilina [8].

La nafcilina es la primera opción en el tratamiento de la endocarditis causada por estafilococos en pacientes que no tengan válvulas cardíacas artificiales [9]. También se emplea en el tratamiento de la mastitis [10], de la osteomielitis [11], en infecciones de la piel y en meningitis [12].

Se absorbe poco e irregularmente por vía oral [13], siendo la absorción menor con la ingesta de comida. Los niveles de concentración tras una inyección intramuscular son bajos, por lo tanto, la vía de administración más práctica es la vía intravenosa.

El antibiótico se excreta principalmente por el hígado, y en menor medida, por los riñones. Los niveles séricos son elevados y la vida media es prolongada por el probenecid. La dosis habitual de la nafcilina es de 6 a 12 g/día en un adulto, dependiendo de la gravedad de la infección, y de 100 a 200 mg/kg/día para los niños.

La mayoría de los antibióticos β -lactámicos no exhiben propiedades fosforescentes, sin embargo, la nafcilina debido a la presencia de un grupo naftalénico en su estructura química, posee un elevado rendimiento cuántico de fosforescencia a temperatura ambiente (FTA), lo que ha sido demostrado por la posibilidad de determinar FTA en un medio organizado, tal como micelas, o incluso en disolución en ausencia de medios organizados, pero de elevada viscosidad [14] [15][16].

2. Sistemas dispensadores de medicamentos

Los sistemas dispensadores de medicamentos (*drug delivery systems, DDS*), se definen como formulaciones o dispositivos que permiten la introducción de una sustancia terapéutica en el cuerpo y mejora su eficacia y seguridad al controlar la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación del fármaco [17]. Este proceso incluye la administración del producto terapéutico, la liberación de los principios activos y su consiguiente transporte a través de las membranas biológicas al sitio de acción. A cada medicamento le correspondería un sistema único capaz de entregar eficientemente su carga terapéutica al área adecuada para ser tratada sin efectos secundarios no deseados [18]. Y, a diferencia de las terapias tradicionales, que muestran una curva en forma de sierra de la concentración plasmática del fármaco, los DDS están diseñados para mantener los niveles terapéuticos durante el período de tratamiento [19].

Las características de un sistema ideal de administración de medicamentos son:

- Aumentar la biodisponibilidad del fármaco.
- Prever la entrega controlada de medicamentos.

- Transportar el fármaco intacto al sitio de acción evitando los tejidos del huésped no enfermos.
- El producto debe ser estable y la entrega debe mantenerse bajo variaciones fisiológicas.
- Que disperse bien el fármaco.
- Que se pueda aplicar con otros principios activos.
- Fácil administración a los pacientes.
- Seguro.
- Debería ser rentable.

Durante la segunda parte del siglo XX, un enfoque integrado de los fenómenos fisiológicos, biológicos y bioquímicos, combinado con el rápido progreso de la química macromolecular y el surgimiento de la nanotecnología, revolucionó la farmacología y la medicina. Han aparecido sistemas innovadores de administración de fármacos de tamaño nanométrico que llevaron al surgimiento de nuevas estrategias terapéuticas, así como a mejoras significativas en la efectividad y tolerabilidad de los fármacos comercializados y a una simplificación de su administración.

El fármaco puede introducirse en el cuerpo humano por diversas vías anatómicas. La elección de la vía de administración depende de la enfermedad, el efecto deseado y el producto disponible. Los medicamentos pueden administrarse directamente al órgano afectado por la enfermedad o administrarse sistémicamente y dirigirse al órgano enfermo. Las rutas anatómicas principales son, *Tabla 1* [17]:

Rutas anatómicas
Oral
Parenteral
Transdermal
Transmucosal
Nasal
Colorrectal
Pulmonar
Cardiovascular
Cerebral

Tabla 1. Rutas de administración de los DDS

La liberación de los fármacos puede ser [17]:

- Sostenida, cuando la acción del fármaco se extiende, pretendiendo reducir la frecuencia de toma.

- Controlada, que implica la regulación de la administración del medicamento, generalmente mediante un dispositivo. Se pretende controlar la cantidad liberada durante un período definido de tiempo independiente de los entornos locales.
- Programada. La liberación puede ser llevada a cabo mediante mecanismos físicos, como hinchazón y rotura del sistema o acciones químicas, como la degradación enzimática.

Se han estudiado muchos sistemas liberadores de fármacos, como pueden ser las enzimas [20], los liposomas [21], los anticuerpos [22], las microesferas [23] o los niosomas [24]. En este trabajo de fin de máster, se prueban polímeros de impresión molecular, explicados con más detalle en el apartado I.3.

Los polímeros impresos molecularmente son materiales al alza en la elaboración de DDS porque pueden proporcionar perfiles de administración mejorados y un tiempo de liberación más prolongado, así como una mayor permanencia del fármaco en el paciente debido a su estructura entrecruzada. En estos sistemas, el principio activo se dispersa dentro de una matriz polimérica, diseñada para liberarlo bajo unas condiciones fisiológicas en concreto, de forma regulada. Además, en aquellos medicamentos que tienen una ventana terapéutica estrecha, mantienen la concentración por debajo de los niveles donde los posibles efectos secundarios dañinos se vuelven prevalentes [25].

Otra potencial ventaja de los polímeros impresos como DDS es que, en el caso de que se use una mezcla racémica de un medicamento, pueden liberar selectivamente el enantiómero más efectivo [26].

Sin embargo, estos materiales tienen la desventaja de que el fármaco puede ser liberado inesperadamente si rompe la matriz al pasar un umbral crítico, pudiendo darse consecuencias graves si el fármaco es tóxico para el paciente a concentraciones elevadas. Para evitar este problema, se están desarrollando sistemas que se degradan uniformemente al entrar en contacto con los fluidos fisiológicos. Esto se consigue con polímeros portadores que solo se erosionen en la superficie, y asegurándose de que el fármaco está disperso por toda la matriz. De esta forma, se puede conseguir una liberación lenta y constante, con la concentración correcta para que sea efectivo [27].

Al contemplar el uso de polímeros impresos como DDS, hay que tener en cuenta el proceso de impresión utilizado. La elección de seguir un proceso covalente o no covalente influirá en la especificidad del reconocimiento y en la cinética de unión y liberación de los sitios del polímero.

El método covalente normalmente ofrece la capacidad de reconocimiento más específica, pero las cinéticas son lentas y los números de enlaces covalentes reversibles son limitados, teniendo muchas veces que sintetizar monómeros molde. Por lo cual, el método no covalente ha sido el más usado en los últimos años. Este método de síntesis generalmente da como resultado polímeros de impresión molecular con un rango de especificidades de sitios de unión [27].

3. Polímeros de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular (*molecularly imprinted polymers*, MIP) son polímeros sintéticos con la capacidad de reconocimiento molecular, de forma que se unen y liberan especies moleculares específicamente. Los MIP poseen un alto grado de entrecruzamiento, con la orientación espacial de los grupos funcionales definida [28] [27].

El proceso de impresión molecular consiste en la síntesis de una matriz polimérica altamente entrecruzada, alrededor de una molécula molde. La estructura de la matriz polimérica es macroporosa, con microcavidades complementarias a la molécula molde.

En el primer paso del proceso, el monómero funcional elegido interactúa con la molécula molde, formándose un complejo estable, a través de un enlace covalente o no covalente. Los monómeros funcionales se colocan alrededor de la molécula molde y se fijan a ella mediante copolimerización con el agente entrecruzador. El siguiente paso implica la eliminación de la molécula molde como, por ejemplo, mediante extracción con un solvente. Los sitios de unión que quedan libres en la matriz polimérica son complementarios en forma con la molécula molde, de esta forma la reconoce y se une selectivamente a ella [29]. El esquema del proceso se presenta en la *Figura 3*.

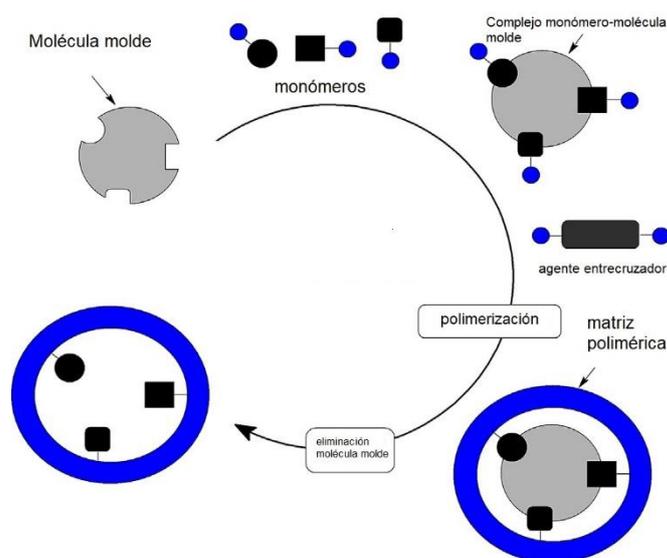


Figura 3. Esquema del proceso de impresión molecular.

Las moléculas molde deben contener grupos funcionales que permanezcan inertes durante la polimerización y otros grupos que puedan formar el complejo monómero-molécula molde. Además, la molécula tiene que ser química y térmicamente estable. Pueden ser iones, moléculas orgánicas, biomacromoléculas, células y virus.

Un monómero funcional debe permitir obtener cavidades muy específicas. Generalmente, los monómeros están en mayor proporción que las moléculas molde, para favorecer la formación del complejo. Algunos típicos son: la acrilamida, el ácido acrílico, el estireno, 4-vinilpirideno.

El agente entrecruzador fija el monómero alrededor de la molécula molde, lo que forma una red polimérica entrecruzada rígida, resistente a la posterior eliminación del molde. El agente más usado es el etilenglicol dimetacrilato.

El disolvente (porógeno) es el medio de reacción en el proceso de la polimerización. Afecta a la eficiencia e interacción entre los monómeros y los moldes, las propiedades de absorción y la morfología del polímero. Pueden actuar como disolvente el cloroformo, el acetonitrilo, el metanol, etc. [29].

Los MIP pueden ser usados como receptores artificiales en separaciones [30], como sensores [31], como catalizadores [32], y en el desarrollo de fármacos y en su detección [33].

3.1. Proceso sol-gel: xerogeles

En este trabajo, para la síntesis de los polímeros se usa el método sol-gel. Se parte de una solución química (sol) que actúa como precursor de una red integrada, de partículas discretas o polímero. Los precursores típicos son cloruros y alcóxidos metálicos, que tras una serie de reacciones de hidrólisis y policondensación, forman una dispersión coloidal, que por una polimerización lenta forma un gel. Los alcóxidos son sensibles a la humedad, por lo que se usan alcoholes como solvente común para la solvólisis necesaria para la formación del gel [34].

Un gel polimérico consta de una red, hinchada por el solvente. El solvente está atrapado por la red de partículas y así el líquido no se separa, mientras que, a su vez, el líquido evita que el sólido colapse en una masa compacta.

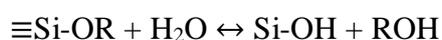
La deshidratación parcial de un gel produce un residuo sólido elástico, llamado xerogel. Finalmente, este material es completamente deshidratado y, a veces tratado térmicamente, para obtener el material estructurado final.

Los materiales sol-gel se caracterizan por su durabilidad, estabilidad y la posibilidad de sufrir modificaciones, como incorporar reactivos, enzimas... usando alcóxidos funcionalizados y precursores apropiados. Actualmente, los que tienen una base silíceas son los más usados, que son los empleados en este proyecto.

3.1.1. Síntesis

El esquema general de preparación de xerogeles de base silíceas es el siguiente:

a) Hidrólisis



b) Condensación



Cuando la reacción está en curso, la viscosidad de la matriz aumenta gradualmente dependiendo del grado de entrecruzamiento, hasta convertirse en un material homogéneo y rígido que, después, se seca a temperatura ambiente para obtener el producto final. Las etapas de hidrólisis y condensación provocan la formación de subproductos de bajo peso molecular, como el alcohol y el agua. Estas pequeñas moléculas se eliminan del sistema por secado, lo que da como resultado una red tetraédrica de SiO₂. Durante el secado, el alcohol y el agua se evaporan de los poros haciendo que el gel se contraiga. Los xerogeles son significativamente menos porosos que sus homólogos hidratados [35].

El proceso depende en gran medida del disolvente utilizado, el catalizador usado para la hidrólisis, la temperatura de la reacción, el tiempo y la naturaleza del grupo funcional unido al Si-OR. Estas variables tienen una gran influencia en las características fundamentales de los materiales, como la homogeneidad, la porosidad, el índice de refracción, el área de superficie y las propiedades mecánicas y térmicas [36].

3.1.2. Características de los xerogeles

Algunas de las características de los xerogeles que los hacen oportunos para aplicaciones analíticas son [16]:

- Pueden presentar diversas conformaciones: laminados, en forma de bloque, particulados, fibras, esferas...
- Gracias a las condiciones suaves en las que se forman, es posible la inclusión de moléculas termo- o/y fotosensibles en su estructura cuyo uso, en muchos casos, está limitado.
- Poseen alta rigidez, no se hinchan en medio orgánico o acuoso, son ópticamente transparentes y electro-, foto- y químicamente estables.
- Pueden trabajar con moléculas molde hidrofílicas en medios acuosos.

4. Métodos ópticos

Los métodos ópticos de análisis son aquellos que implican la medida de la radiación electromagnética emitida por la materia o que interacciona con ella.

Cuando la radiación electromagnética incide sobre una muestra material, esta puede: ser absorbida por la muestra, llegando a transformarse en energía térmica; ser dispersada o re-emitida, con o sin cambio en la longitud de onda; originar un cambio en las propiedades de radiación, sin necesidad de producirse absorción o emisión, como consecuencia de la interacción. Por otra parte, la muestra puede emitir radiación electromagnética si se le excita bajo determinadas condiciones [37].

El espectro electromagnético abarca un amplio rango de longitudes de onda y frecuencias, como se puede ver en la *Figura 4*.

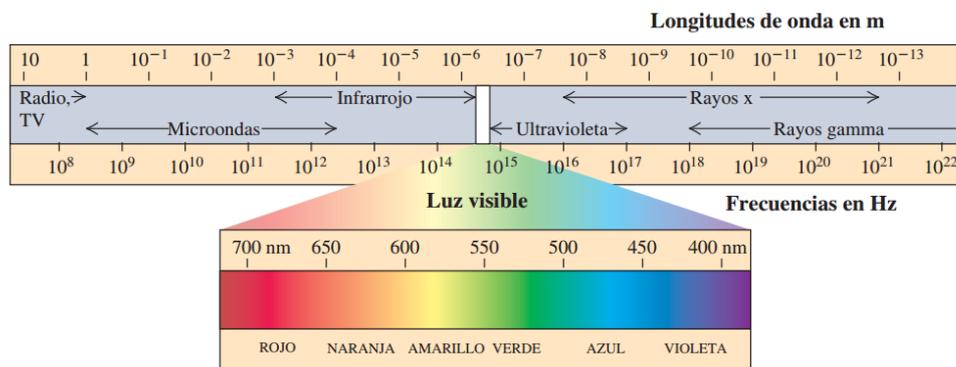


Figura 4. Diagrama del espectro electromagnético.

Los métodos ópticos se pueden clasificar en [18,19]:

- Métodos espectroscópicos: son aquellos en los que existe intercambio de energía entre la radiación electromagnética y la materia. En esta metodología se miden cambios en la intensidad de la energía electromagnética que se registran en forma de espectros, siendo estos cambios debidos a transiciones entre distintos niveles energéticos. Se basan en procesos de absorción (UV-visible, IR, microondas, absorción atómica, rayos X, etc.) y en procesos de emisión (luminiscencia, espectrometría de emisión, fluorescencia de rayos X, fluorescencia atómica y molecular, etc.).
- Métodos no espectroscópicos: Se caracterizan por no tener lugar intercambio de energía como consecuencia de la interacción materia-radiación electromagnética. 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 procesos de dispersión (turbidimetría, nefelometría), refracción (refractometría, interferometría), difracción (rayos X, electrones) y en rotación óptica (polarimetría, dicroísmo circular).

En este trabajo de fin de máster se utilizarán los métodos espectroscópicos de absorción UV-visible, IR y luminiscentes.

4.1. Instrumentación óptica

Las partes básicas de los instrumentos que se emplean para medir estos fenómenos son muy similares, salvando alguna diferencia en concreto. Las propiedades que se necesitan de estos componentes son las mismas, independientemente de la región del espectro en la que trabajen [37][39].

Los instrumentos espectroscópicos típicos están compuestos por:

- Fuente de radiación. Debe generar un haz medible con facilidad y estable, que se pueda regular. Las fuentes espectroscópicas más usadas son: continuas, emitiendo una radiación cuya intensidad cambia ligeramente en función de la longitud de onda; o de líneas, las cuales abarcan un intervalo limitado de longitudes de onda. También hay fuentes de rayo láser, que aportan altas intensidad, anchos de banda angostos y salidas coherentes.
- Recipientes para las muestras. Deben ser de un material transparente a la radiación en la región del espectro de interés. La mayoría son celdas o cubetas.
- Selector de longitud de onda. Seleccionan un haz de radiación monocromática. Obtener ancho de banda angosto intensifica la sensibilidad, puede proporcionar selectividad y se emplea para obtener una relación lineal entre la señal óptica y la concentración.
- Detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica. Deben ser sensibles, tener una alta relación señal-ruido, una respuesta constante a un amplio intervalo de longitudes de onda, un tiempo de respuesta rápido y una señal de salida cero si no hay iluminación.
- Procesador de señal y sistema de lectura. Se amplifica la señal eléctrica proveniente del transductor. Puede cambiar la fase de la señal y filtrarla para eliminar componentes indeseables. Además, el procesador ejecuta operaciones matemáticas con la señal, como derivación, integración o conversión a escala logarítmica.

4.2. Espectrometría por absorción ultravioleta-visible

La espectroscopía de absorción visible-ultravioleta se basa en la absorción de dicha radiación por el analito, originando un estado activado, el cual posteriormente pierde su exceso de energía en forma de calor. Implica la medida de la fracción de luz de una longitud de onda dada que pasa a través de una muestra. En esta técnica [39], se realiza la medición de la transmitancia (T), o de la absorbancia A de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de b cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer, *Ecuación 1*:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

Ecuación 1. Ley de Beer.

Donde A es la absorbancia, T la transmitancia, P_0 es la potencia radiante en watts que incide en la muestra, P es la potencia radiante que transmite la muestra, b la longitud sobre la que ocurre la atenuación, c la concentración en unidades especificadas y ϵ la constante de absorptividad. La absorptividad es una propiedad característica de la sustancia absorbente y depende de la longitud de onda entre otros factores.

Sin embargo, la proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración solo se cumple en disoluciones muy diluidas, observándose desviaciones al crecer la concentración. Las desviaciones pueden ser: reales, que dependen de las interacciones soluto-soluto, soluto-disolvente, y del índice de refracción del medio; instrumentales, debido a la radiación policromática, presencia de radiación parásita originada por reflexión de los componentes ópticos, errores de lectura y celdas desajustadas; y desviaciones químicas, fruto de procesos químicos en lo que participan las especies absorbentes [37].

Los instrumentos para medir la absorción de radiación ultravioleta y visible están compuestos por: fuentes, selectores de longitud de onda, recipientes para la muestra, transductores de radiación, procesadores de señal y dispositivos de lectura, como ya se enumeró en el apartado 4.1. El esquema básico de un equipo se presenta en la *Figura 4*:

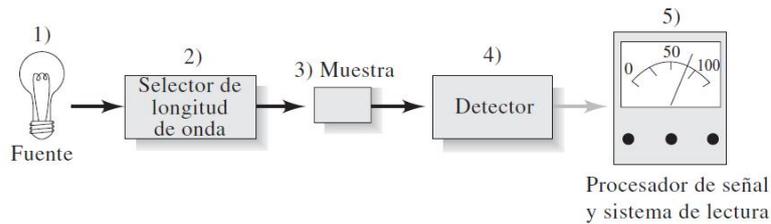


Figura 4. Esquema espectrómetro de absorción.

Como se ve en el esquema, el haz de la fuente pasa por el selector de longitud de onda y luego atraviesa la muestra, aunque en algunos casos las posiciones del selector y la muestra están invertidas. A su vez, el haz puede ser sencillo o doble. En los instrumentos de haz sencillo, hay solo un haz de radiación que, después de pasar a través de la muestra, llega al detector. Para comparar lo medido con el blanco, este debe sustituir a la muestra en cada lectura. En cambio, en los de haz doble, la radiación pasa alternativamente 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 [37].

En absorción, es necesario disponer de una fuente continua cuya potencia radiante no cambie de forma brusca en un intervalo de longitud de onda. La fuente puede ser una lámpara de deuterio e hidrógeno, de filamento de tungsteno, de arco de xenón, o un diodo en función de las longitudes de onda a las que se quiere medir.

Las celdas o cubetas en las que se coloca la muestra y el disolvente deber ser de un material que deje pasar la radiación de la región espectral de interés. Se requiere cuarzo o sílice fundido

para trabajar en la región ultravioleta. Los vidrios de silicato se emplean para longitudes mayores, de hasta 2000 nm. También se pueden utilizar recipientes de plástico en la región visible. Las mejores celdas tienen ventanas perpendiculares a la dirección del haz para reducir al mínimo las pérdidas por reflexión [37].

Esta técnica se usa ampliamente en la determinación cuantitativa de una gran cantidad de especies inorgánicas [40], orgánicas [41] y biológicas [42]. También se pueden realizar análisis cualitativos, pero los espectros obtenidos aportan menos información que otros métodos.

4.3. Espectrometría de fotoluminiscencia

Fluorescencia y fosforescencia son dos técnicas luminiscentes en las que las moléculas del analito se excitan mediante fotones y producen, como consecuencia, la emisión de fotones de diferente frecuencia absorbida [18].

La fotoluminiscencia es la emisión de radiación de una sustancia que se produce a partir de estados excitados por fotones. Según la naturaleza del estado excitado se distingue entre fluorescencia y fosforescencia.

Un estado electrónico de una molécula en el cual todos los espines de los electrones están apareados se llama estado singlete o simplete, *Figura 5 (a)*. Por otro lado, el estado fundamental de un radical libre es un estado doble, ya que existen dos orientaciones posibles que adoptar bajo un campo magnético. Cuando un estado con dos electrones de una molécula es excitado y pasa a un nivel de energía superior, puede ocurrir que se conserve su espín o que se produzca una inversión. En el primer caso se tiene un estado excitado simplete, *Figura 5 (b)*. Mientras que, en el segundo, se tiene un estado triplete, los espines son paralelos, se encuentran en la misma dirección, *Figura 5 (c)* [39].

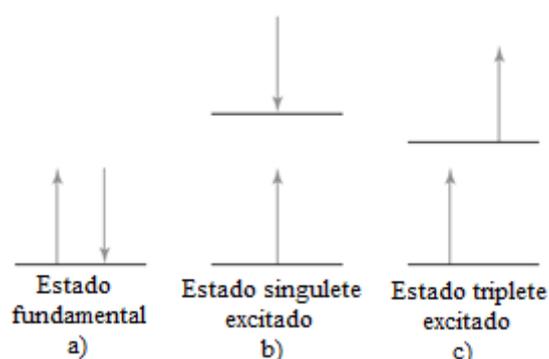


Figura 5. Estados electrónicos del espín de moléculas: a) el estado energético fundamental, b) y c) estados excitados.

Las transiciones desde el estado sencillo fundamental hasta el estado triplete son poco probables, pasan a través del estado sencillo excitado. En la *Figura 6*, se representa un diagrama parcial de niveles de energía, llamado diagrama de Jablonski, para una molécula fotoluminiscente, donde S_0 es el estado fundamental, S_1 y S_2 estados electrónicos sencillos excitados, y T_1 un estado triplete.

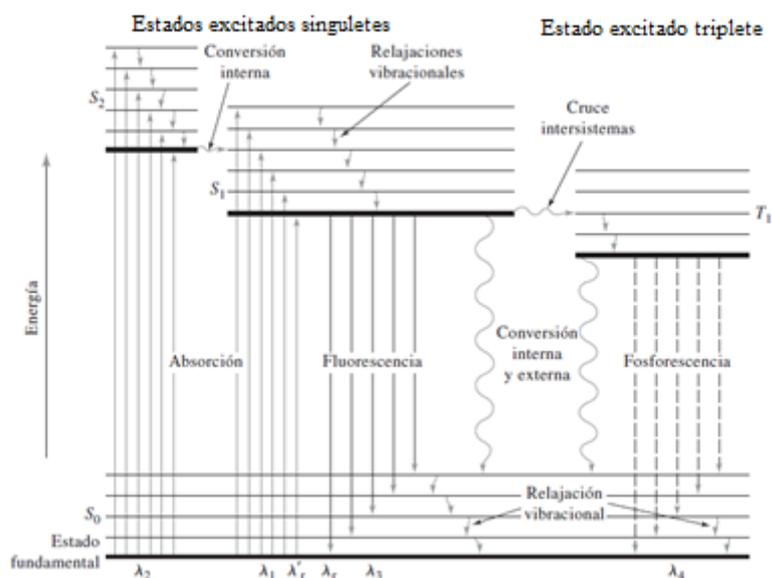


Figura 6. Niveles de energía en un sistema fotoluminiscente.

En sistemas condensados, como una disolución, el exceso de energía vibracional se pierde de forma inmediata debido a los choques entre las moléculas excitadas y el disolvente, es el fenómeno conocido como relajación vibracional. Además, cuando dos niveles de energía electrónicos están tan próximos como para que haya solapamiento de los niveles, puede ocurrir conversión interna, que consiste en que se pase a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de radiación. Estos procesos transcurren a tiempos muy pequeños, del orden de 10^{-12} s.

El proceso de emisión de un fotón desde un estado excitado sencillo al fundamental corresponde al fenómeno de fluorescencia. ocurre justo después de la excitación (en 10^{-9} a 10^{-7} s), por lo cual, no es posible visualizar la fluorescencia una vez eliminada la fuente de excitación [37] [39].

Mientras una molécula está en un estado excitado, se puede dar un cambio de espín en un electrón, con lo que se adquiere el estado triplete, conociéndose este proceso como *cruzamiento entre sistemas*. Una vez adquirido el estado triplete, la molécula puede llegar al nivel vibracional inferior mediante relajación vibracional y, una vez ahí, emitir un fotón para volver al estado fundamental. Este proceso corresponde al fenómeno de fosforescencia.

La instrumentación para medir la fotoluminiscencia comparte los componentes principales con el resto de técnicas espectroscópicas: una fuente de radiación, un sistema selector de longitudes de ondas, un detector y un procesador de señal. Cabe destacar que, en fotoluminiscencia, existen dos sistemas selectores de longitudes de onda, uno para seleccionar la longitud de onda de excitación y otro para la emisión. En la *Figura 7*, se representa un esquema básico de un espectrofotómetro de fotoluminiscencia [39].

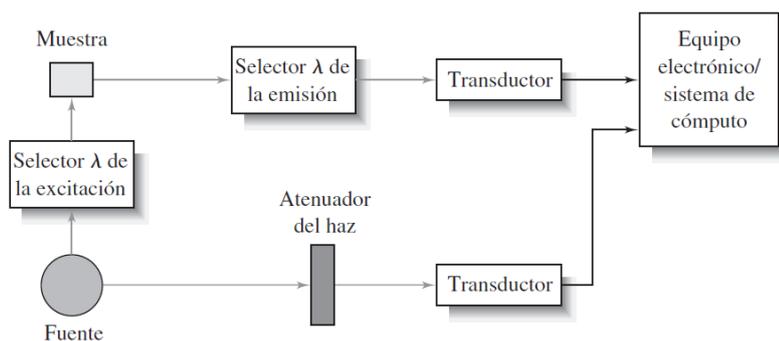


Figura 7. Esquema básico de un espectrofotómetro de fotoluminiscencia.

Uno de los aspectos más interesantes de los métodos luminiscentes es su inherente sensibilidad, con límites de detección que son casi siempre de uno a tres órdenes de magnitud inferiores a los encontrados en la espectroscopía por absorción. De hecho, en el caso de especie seleccionadas en condiciones controladas, se han detectado moléculas únicas mediante espectroscopia por fluorescencia. Otra ventaja de estos métodos radica en sus amplios intervalos de linealidad, que también son superiores a los de absorción [43].

En cuanto a las aplicaciones, sobre todo la fluorescencia, destaca como herramienta para determinar un amplio número de especies, tanto sustancias inorgánicas [44], como orgánicas [45]. Gracias a la alta sensibilidad de estos métodos, incluso los hace adecuados en determinaciones forenses [46].

4.4. Espectrometría infrarroja

La región infrarroja (IR) del espectro comprende la región del espectro entre los 0,78 y los 1000 μm . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos, es conveniente dividir el espectro IR en tres regiones: infrarrojo cercano (0,78 a 2,5 μm) medio (de 2,5 a 50 μm) y lejano (50 a 1000 μm). La región en la que más se trabaja cubre las longitudes de 2,5 a 15 μm [38].

La radiación infrarroja no tiene suficiente energía para producir la clase de transiciones electrónicas que se dan mediante radiaciones ultravioleta y visible. Por esto, la absorción de radiación IR se limita a especies moleculares que poseen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales.

Para absorber radiación IR, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar cuando vibra o gira, que es cuando es susceptible al campo eléctrico y este interacciona con la molécula y modifica la amplitud de alguno de sus movimientos [39].

Hay tres tipos de equipos para la medición de la absorción en el IR: espectrofotómetros dispersivos con monocromador de red, espectrómetros de transformada de Fourier y fotómetros no dispersivos con filtro. En la actualidad, los más usados son los de transformada de Fourier

para efectuar mediciones en el IR mediano y lejano, aunque también hay de este tipo para el cercano.

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 *Figura 8*, se puede ver un esquema de este equipo.

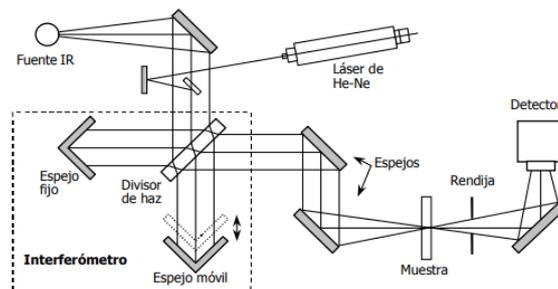


Figura 8. Esquema de un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier.

Cuenta con un interferómetro de Michelson, que está constituido por dos espejos, uno móvil y uno fijo y un divisor de haz. Al incidir la luz colimada 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 para ser conducidos a través de la muestra por un sistema de espejos hasta llegar al detector. El objetivo de dividir el haz es conseguir la interferencia de dos haces de luz que recorren distancias distintas, que se regulan con la posición del espejo móvil [39].

Algunas de los usos de la espectroscopía de IR van desde el análisis de compuestos orgánicos [47], tratamiento de fluidos biológicos [48] a controles en la industria farmacéutica, química, petrolera y alimentaria [49].

II. Objetivos

La eficacia en el funcionamiento de los medicamentos viene limitada, en muchas ocasiones, por una baja capacidad de la sustancia para alcanzar el punto necesario. Esta incapacidad puede deberse a una inaccesibilidad física o química, a una dilución excesiva o a una tasa de degradación muy elevada. Uno de los sistemas que permite mejorar estos puntos son los sistemas dispensadores de medicamentos, que, como ya se definió en el apartado I.2. son formulaciones o dispositivos que permiten la distribución de una sustancia terapéutica en un sistema biológico.

El objetivo principal del trabajo es la síntesis de distintos materiales poliméricos cargados con nafcilina y el estudio de la capacidad de dichos materiales para liberar el fármaco en dos medios orgánicos simulados: gástrico e intestinal.

Este objetivo genérico puede, a su vez, estructurarse en cuatro objetivos particulares:

- Síntesis de materiales xerogel cargados con nafcilina y sus respectivos materiales control.
- Caracterización químico-física de los materiales sintetizados.
- Caracterización espectroscópica de la nafcilina en disolución.
- Estudio de la liberación del fármaco de los diferentes materiales sintetizados cuando estos son expuestos a medios biológicos sintéticos: gástrico e intestinal.

III. Parte experimental

1. Materiales y reactivos

1.1. Material

- Matraces aforados (de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mL)
- Erlenmeyers de 250 mL
- Vasos de precipitado (de 10, 50, 100, 250, 500 mL)
- Vidrios de reloj
- Tubos de ensayo
- Probetas (10, 50, 10 mL)
- Frascos de 30 y 50 mL
- Pipeta Pasteur 1 mL
- Pipeta aforada 5 mL
- Propipeta
- Embudo de cristal
- Filtros de celulosa de grado 40, tamaño de poro 8 μm , diámetro 110 mm
- Soporte y pinzas
- Tubos de centrifuga
- Barras magnéticas
- Imán
- Cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 mm.

1.2. Reactivos

- Agua mili-Q
- $\text{NH}_4(\text{OH})$ 25% de Panreac
- HCl 37% de Emsure
- Etanol absoluto de VWR Chemicals
- Tetraetoxisilano de Sigma Aldrich (TEOS, T)
- Sal de nafcilina sódica monohidratada de Sigma Aldrich
- Metiltrietoxisilano de Fluka (MTEOS, M)
- 3-aminopropiltrietoxisilano de Sigma Aldrich (APTEOS, A)
- Metanol de VWR Chemicals
- Yoduro de potasio de VWR Chemicals
- Sulfito sódico anhidro de Acros
- buffer fosfato salino (CaCl_2 , MgCl_2) de Gibco by Life Technologies (PBS)
- Hidróxido sódico en lentejas de VWR Chemicals
- Fosfato ácido de dipotasio trihidratado de Merck
- Pancreatina de páncreas de cerdo de Sigma Aldrich

- Cloruro de sodio de VWR Chemicals
- Feniltrimetoxisilano de Sigma Aldrich (PhTMOS, Ph)

2. 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
- 670-FT-IR con módulo ATR Varian
- *Software* Resolutions Pro versión 5
- TEM JEOL JEM-2000 EX II Electron Microscope
- *Software* Gatan Digital Micrograph
- Micropipetas HTL (0,5-10, 10-100, 100-1000 μL)
- 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
- Estufa Heraeus
- Agitador magnético con calefacción Lbx Instruments H03D Series
- Agitador magnético con calefacción P Selecta AGIMATIC-E
- *Software* ImageJ

3. Disoluciones y metodología

3.1. Preparación de disoluciones

Para llevar a cabo este trabajo, se requirió la preparación de varias disoluciones:

- Disolución de nafcilina 10^{-3} M. Se pesaron 0,0227 g del fármaco para 50 ml de H_2O . A partir de ésta, se preparan disoluciones de nafcilina de concentraciones menores, tanto en agua como en etanol y metanol.
- Disolución de Na_2SO_3 0,1 M en H_2O . Se pesaron 0,3115 g del compuesto y se llevaron a 25 mL.

- Disolución de KI 3 M. Se pesaron 12,45 g del compuesto y se llevaron a 25 mL.
- Disolución reguladora de pH 7,4. A partir de una disolución reguladora de stock 0,5 M, se diluye hasta 0,1 M.
- Disolución de 1 M HCl, preparada por dilución de HCl comercial al 37%.
- Disolución de K_2HPO_4 0,16 M. Se pesan 3,4 g y se llevan a 125 mL en agua.
- Disolución de NaOH 0,2 M preparada por disolución directa de NaOH sólido en agua.

3.2. Preparación de medios biológicos sintéticos

La preparación de los medios biológicos sintéticos se hace siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Europea [50].

3.2.1. Medio intestinal

En un matraz aforado de 500 mL se mezclan 38,5 mL de una disolución de 0,2 M de NaOH con una disolución de 0,16 M K_2HPO_4 . A continuación, suma 5 g de pancreatina. Se añade H_2O sin enrasar y se regula el pH con HCl 1 M hasta conseguir un pH de 6,8. Después, se enrasa con agua hasta 500 mL.

3.2.2. Medio gástrico

En un matraz de 500 ml se vierten 40 ml de HCl 1 M. Se diluye 1 g de NaCl en 50 ml de H_2O y se agregan. Se enrasa y se mide el pH, que da 1,22.

3.3. Protocolos de medida

Se realizarán ensayos de liberación del fármaco desde los materiales sintetizados. Para ello, se elaboran las siguientes preparaciones:

- a) 250 mg de cada compuesto + 5 mL de medio intestinal en tubos de centrífuga.
- b) 250 mg de cada compuesto + 5 mL de medio gástrico en tubos de centrífuga.
- c) 500 mg de cada compuesto + 5 mL de medio gástrico en tubos de centrífuga.
- d) 250 mg de compuestos seleccionados (recubiertos con APTEOS, A-InS y recubiertos con TEOS, T-InS, así como sus respectivos blancos A-BnS y T-BnS) + 2,5 mL de medio gástrico para medición directa en la cubeta de cuarzo.

Todas las muestras de los apartados a, b y c es necesario centrifugarlos a 5300 rpm entre 30 y 45 minutos antes de poder ser medidos en el espectrómetro.

4. Síntesis y lavados de los materiales

Se sintetizaron nanosferas impresas, InS, siguiendo el procedimiento detallado por T. Diaz-Faes López et al. [51], alterando el orden del proceso:

- 1) A 94 mL de etanol, bajo agitación a 600 rpm, se le añadieron lentamente 6,6 mL de NH_4OH 25%. Acto seguido, fueron agregados 8 mL de TEOS. La mezcla se dejó agitando 24 h.
- 2) Pasadas las 24 horas, se adiciona el volumen indicado en la *Tabla 2* del precursor en estudio, y 1 mL de disolución de nafcilina 10^{-3} M y se deja que la disolución continúe bajo agitación hasta el día siguiente. Paralelamente, se está haciendo un blanco, BnS, al que, en vez de 1 mL del antibiótico, se le añade 1 mL de agua.
- 3) Concluido el tiempo de espera, en ambas disoluciones se separa el sólido formado mediante centrifugación durante 30 minutos a 8500 rpm.
- 4) Se decanta la parte líquida y se guarda para posteriores análisis. El sólido se lava con metanol 3 veces, centrifugándolo entre lavados en las condiciones del paso 3). La resuspensión del sólido antes de centrifugar se hace con el vortex.
- 5) Tras el último lavado, se deja secar el sólido en la estufa, a 25°C durante 48 h.

Compuesto precursor	Volumen empleado
APTEOS	0,6 mL
MTEOS	0,6 mL
PhTMOS	0,6 mL
TEOS	0,6 mL

Tabla 2. Compuestos precursores en estudio.

El motivo de añadir la nafcilina en un paso posterior es conseguir que la impresión molecular se produjera en la superficie de la molécula, de forma que la difusión se vea facilitada y, por tanto, la liberación del fármaco.

5. Caracterización espectroscópica

En un primer paso, se hace una caracterización espectroscópica del antibiótico en estudio, nafcilina, en los diferentes medios en los que se trabaja en este estudio: en agua, en etanol, en medio gástrico y en medio intestinal.

5.1. Espectrometría UV-vis

5.1.1. Espectrometría UV-vis en agua

El espectro de absorción ultravioleta-visible de una disolución de nafcilina en agua 10^{-5} M, *Figura 9*, muestra un máximo de absorción a una longitud de onda de 227 nm de 0,5950.

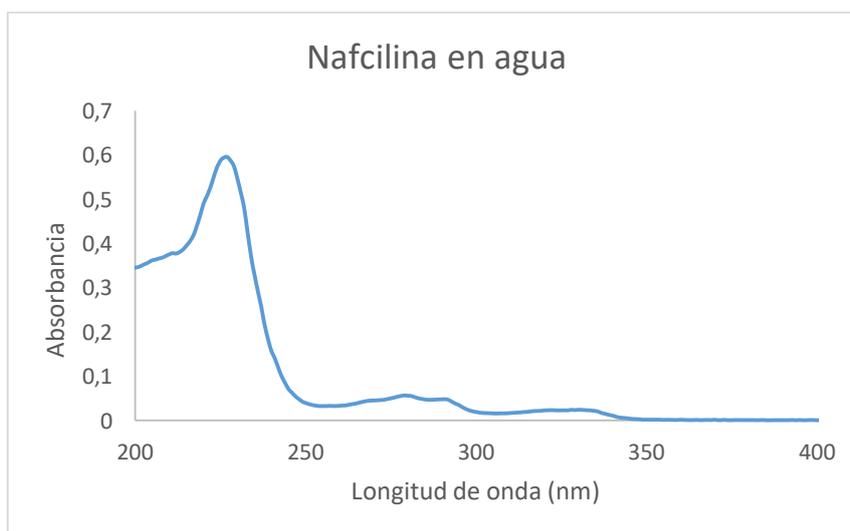


Figura 9. Espectro UV-vis de una disolución de nafcilina en agua 10^{-5} M.

Se realiza una recta de calibrado para comprobar la correcta respuesta instrumental en función de la concentración. Se preparan disoluciones de 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 6×10^{-6} , 8×10^{-6} y 10^{-5} M en agua obteniéndose la recta de calibrado de la *Figura 10*, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9995, lo que indica una respuesta lineal en el rango de concentraciones estudiadas.

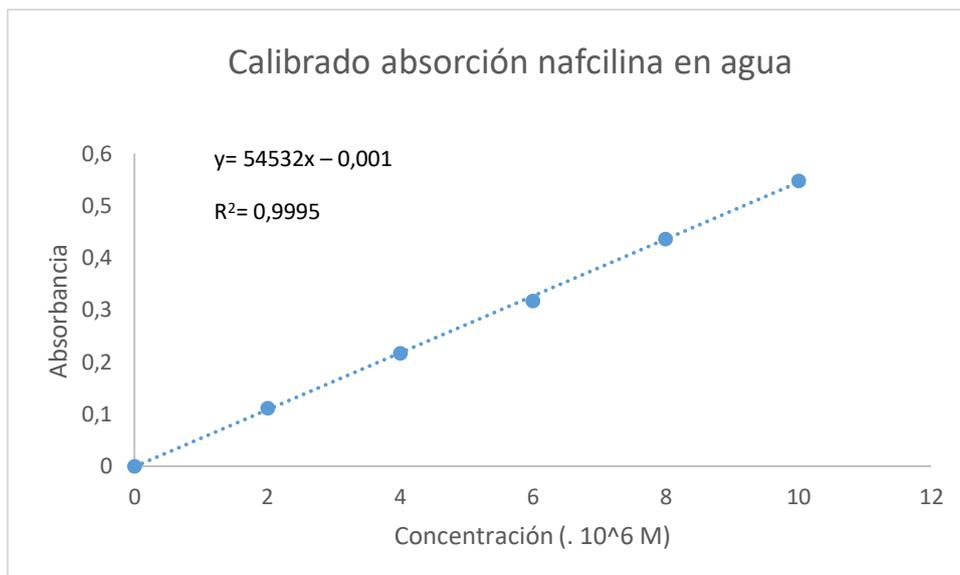


Figura 10. Recta de calibrado de la absorción de nafcilina en agua.

El límite de detección de esta técnica, según la *Ecuación 2*, está en $2,7 \times 10^{-7}$ M.

$$LD = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Ecuación 2. Ecuación del límite de detección.

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la recta de calibrado y b es la pendiente.

5.1.2. Espectrometría UV-vis en metanol

Como los lavados en la síntesis se llevaron a cabo con metanol, también se comprueba la absorbancia del antibiótico en este medio, en la misma concentración. Como se puede en la *Figura 11*, el espectro es muy similar al de la nafcilina en agua, encontrándose ligeramente desplazado, con un máximo a una longitud de onda de 229 nm con una absorbancia de 0,6429.

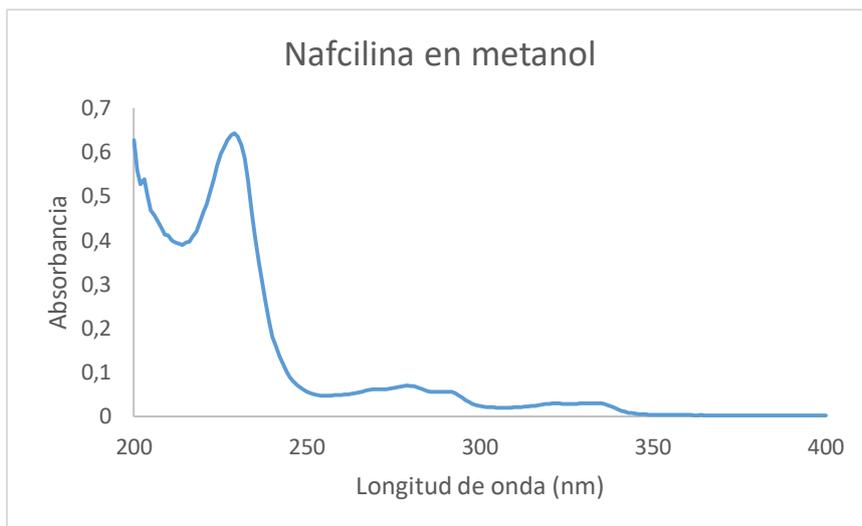


Figura 11. Espectro UV-vis de una disolución de nafcilina en metanol $10^{-5}M$.

5.2. Fluorescencia molecular

5.2.1. Fluorescencia molecular en agua

Para caracterizar la fluorescencia de la molécula, se empieza haciendo un espectro de emisión de una disolución de nafcilina en agua $10^{-5} M$, *Figura 12*, excitando a una longitud de onda de 275 nm y rendijas 20-20, siguiendo el procedimiento de T. Diaz-Faes López et al. [51].

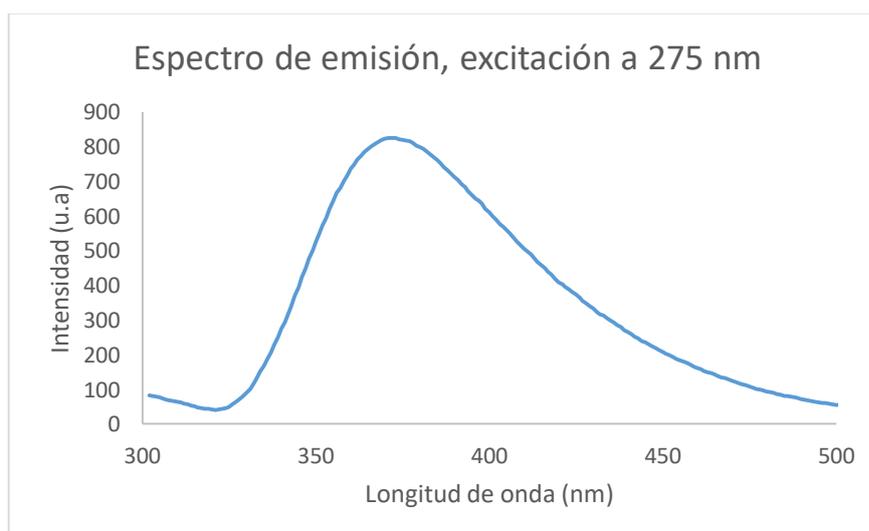


Figura 12. Espectro de emisión excitando a 275 nm de una disolución de nafcilina $10^{-5} M$.

En base a esto, se realiza un espectro de excitación emitiendo en el máximo obtenido, 373 nm, que satura. Por lo cual, se bajan las rendijas a 10-10, obteniendo el espectro representado en la *Figura 13*. Como se puede observar, presenta un máximo en 228 nm, estando cerca del máximo de absorción.

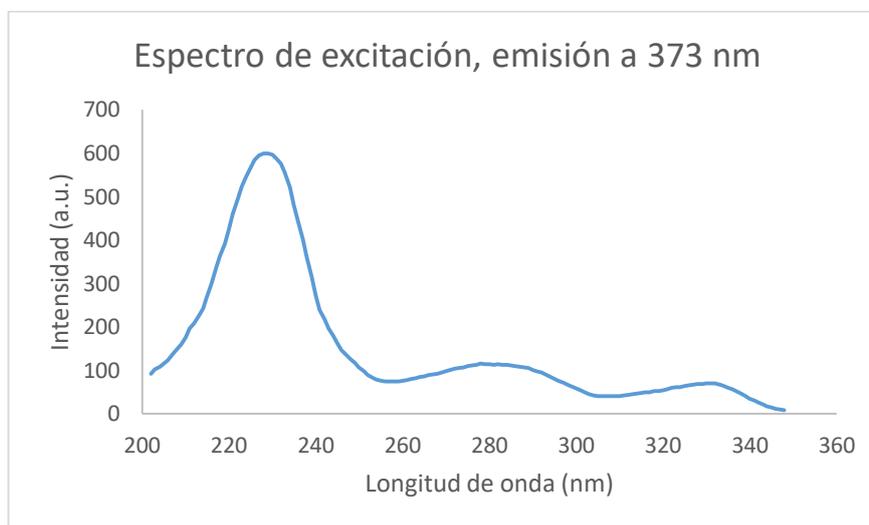


Figura 13. Espectro de excitación de la disolución de nafcilina 10^{-5} M emitiendo a 373 nm.

Para confirmar estos resultados, se realiza otro espectro de emisión, pero ahora excitando a 228, 280 y 330 nm, *Figura 14*, obteniendo 373 nm de máximo en todos, confirmando que, en el espectro de emisión, se excita a 228 y se emite a 373 nm.

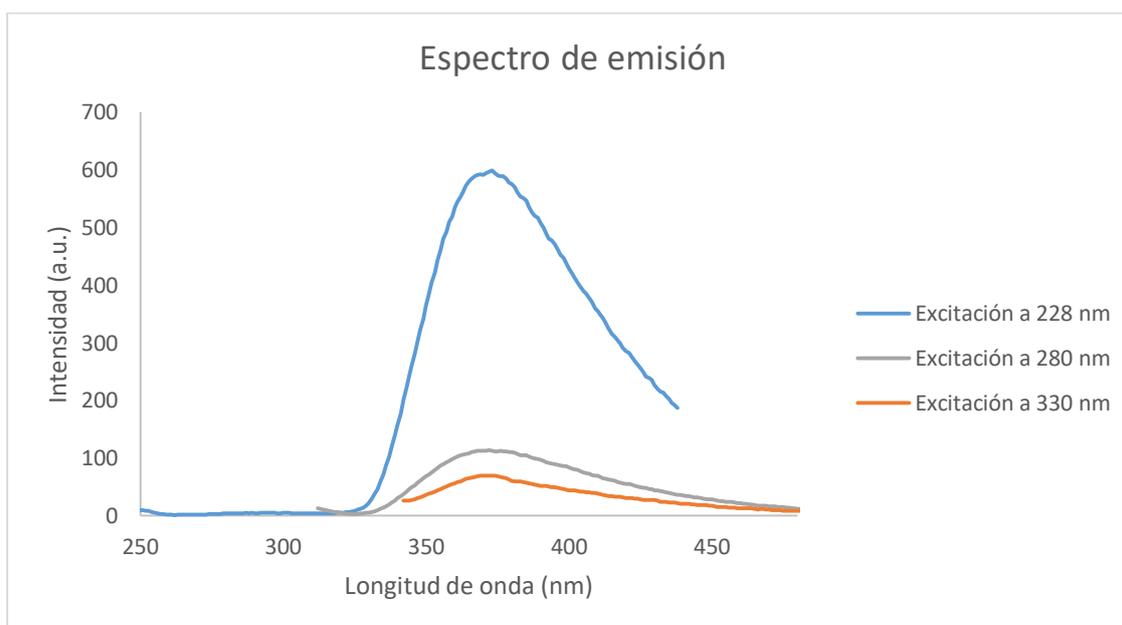


Figura 14. Espectro de emisión para las longitudes de onda de excitación de 228, 280 y 330 nm.

5.2.2. Fluorescencia molecular en etanol

Ya que, posteriormente, se medirá el líquido sobrenadante tras el primer centrifugado, que es un medio etanólico, se considera también caracterizar una disolución de nafcilina en etanol. Se prepara una disolución de nafcilina de concentración 2×10^{-6} M y se practica un espectro de emisión, excitando a 228 nm, según lo obtenido en agua. El máximo aparece a una longitud de onda de 361 nm. Utilizando este valor como máximo de emisión, se localiza el óptimo de excitación que se encuentra a 230 nm. Los espectros correspondientes se representan en la *Figura 15*, todos ellos obtenidos con unas rendijas 10-10.

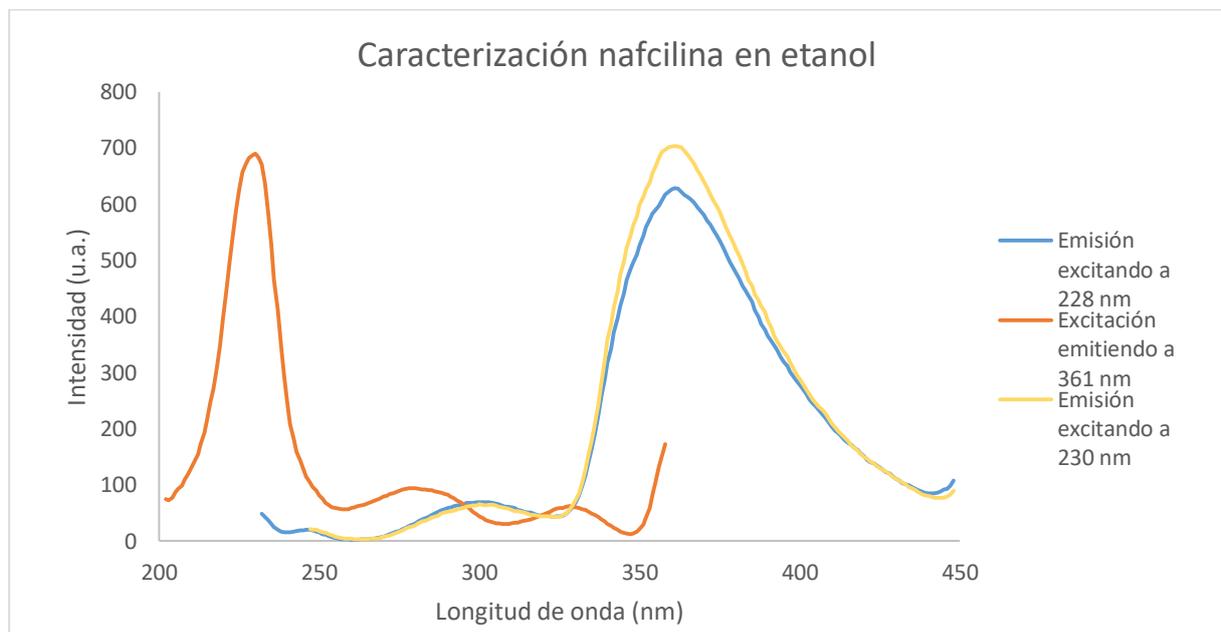


Figura 15. Espectros de fluorescencia de la nafcilina en etanol.

Una vez caracterizada la técnica, se optimiza un calibrado de nafcilina en etanol, *Figura 16*. Se realizó con disoluciones de concentraciones de 5×10^{-7} , 10^{-6} , 2×10^{-6} y 5×10^{-6} M, a partir de los espectros de emisión, excitando a 230 nm y recogiendo las intensidades a 361 nm.

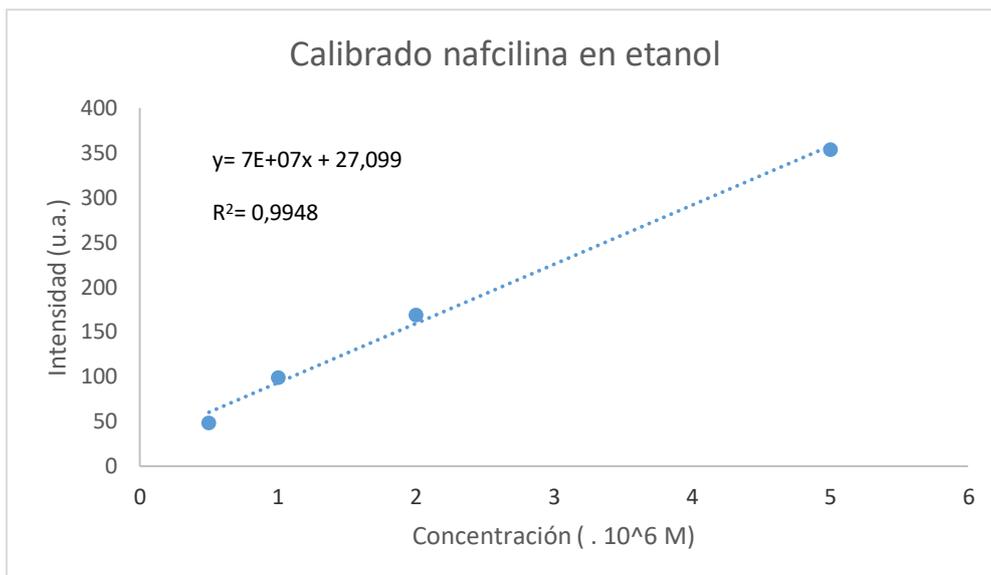


Figura 16. Recta de calibrado de la fluorescencia de la nafcilina en etanol.

El coeficiente de determinación, R^2 , da 0,9948, corroborando la respuesta lineal en el rango estudiado. Anteriormente, se comprobó que a partir de la concentración de 5×10^{-6} M, la recta perdía la linealidad.

A partir de la *Ecuación 2*, se calculó el límite de detección de nafcilina en etanol, dando $5,4 \times 10^{-7}$ M.

5.2.3. Fluorescencia en medio gástrico

Primero, se caracteriza una disolución de nafcilina 10^{-5} M en medio gástrico, con una longitud de onda de 228 nm de excitación, obteniendo el máximo de emisión a 371 nm con rendijas 10-10, *Figura 17*. Como se puede ver, el medio gástrico no interfiere en la señal.

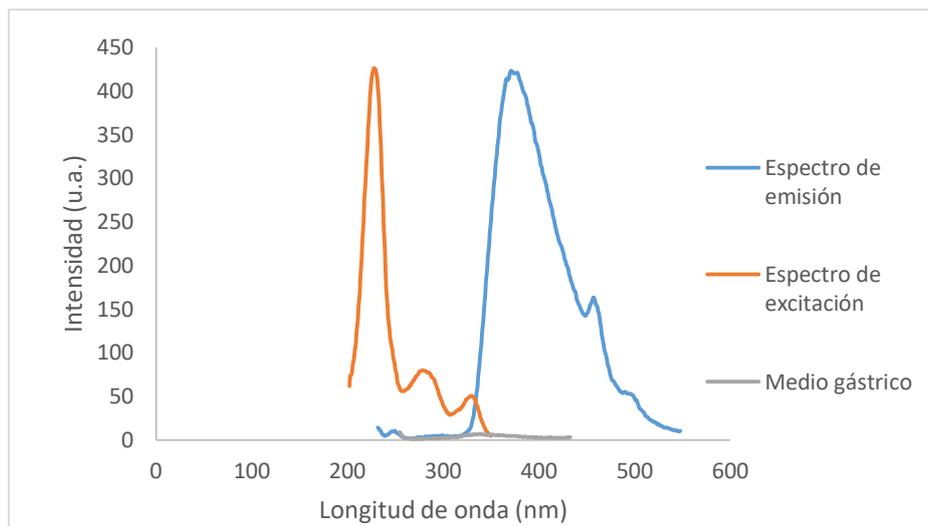


Figura 17. Caracterización de una disolución de nafcilina en medio gástrico.

Se realiza una recta de calibrado para comprobar la correcta respuesta instrumental en función de la concentración. Se preparan disoluciones de 10^{-6} , 2×10^{-6} , 3×10^{-6} , 4×10^{-6} , 5×10^{-6} y 6×10^{-6} M obteniéndose la recta de calibrado de la Figura 18, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9954, lo que indica una respuesta lineal en el rango concentraciones estudiados

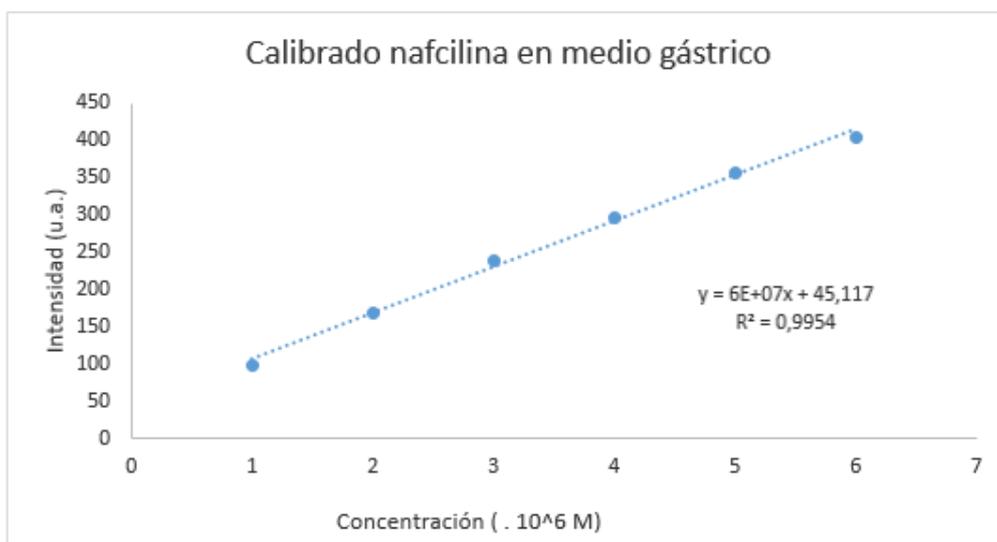


Figura.18. Recta de calibrado de la nafcilina en medio gástrico.

Se calcula el límite de detección del método según la Ecuación 2, dando $4,3 \times 10^{-7}$ M.

5.3. Fosforescencia a temperatura ambiente (RTP)

Clásicamente, la fosforescencia se consigue mejorando sometiendo a las moléculas a temperaturas extremadamente bajas, típicamente las del nitrógeno líquido (77K), ya que se consigue minimizar las relajaciones térmicas. Sin embargo, tener que emplear equipamiento criogénico limita las aplicaciones y encarece el método. Por tanto, es interesante el desarrollo de métodos a temperatura ambiente, para lo que es necesario tener en cuenta tres aspectos fundamentales: reducir la desactivación (*quenching*), facilitar el cruce intersistemas, generalmente mediante el uso de los átomos pesados (Pb, Tl, I...) y potenciar la inmovilización del fosforóforo. El *quenching* dinámico consiste en la pérdida de energía por parte de las moléculas mediante colisiones con el medio, cuando los niveles energéticos de las especies implicadas son similares. Un desactivante de la fosforescencia especialmente importante por su ubicua presencia en agua, es el oxígeno molecular. Para evitar este inconveniente, se desoxigena el medio. Aunque puede hacerse mediante desplazamiento del O₂ por borboteo de nitrógeno, otra alternativa común es el empleo de sulfito de sodio, que reacciona con el oxígeno dando sulfato.

Por otro lado, la interacción espín-órbita se ve incrementada mediante la presencia de átomos o especies pesadas, de manera que el espín deja de estar bien definido y la transición singlete-triplete se vuelve más probable. Al ser los cruces intersistema más frecuentes, se consigue una mejora sustancial de la fosforescencia.

Respecto a la potenciación de la inmovilización del fosforóforo, existen varias técnicas para lograrlo, dando origen a distintas metodologías de RTP. En este trabajo se emplearán altas concentraciones de átomo pesado que, además de fomentar el cruce intersistemas, provee al medio con una viscosidad alta reduciendo la movilidad del luminóforo.

Así, para la caracterización de la fosforescencia a temperatura ambiente, se prepara una disolución de nafcilina 10⁻⁵ M, disolución reguladora PBS, KI y Na₂SO₃. Igual que en el apartado 5.2., se sigue el procedimiento planteado por T. Diaz-Faes López et al. [51], emitiendo primero a la longitud de onda de 283 nm, obteniendo el máximo en 533 nm. Acto seguido, se comprueba la excitación emitiendo a 533 nm, consiguiendo como máximo la longitud de onda planeada. En la *Figura 19* se pueden ver los espectros hallados.

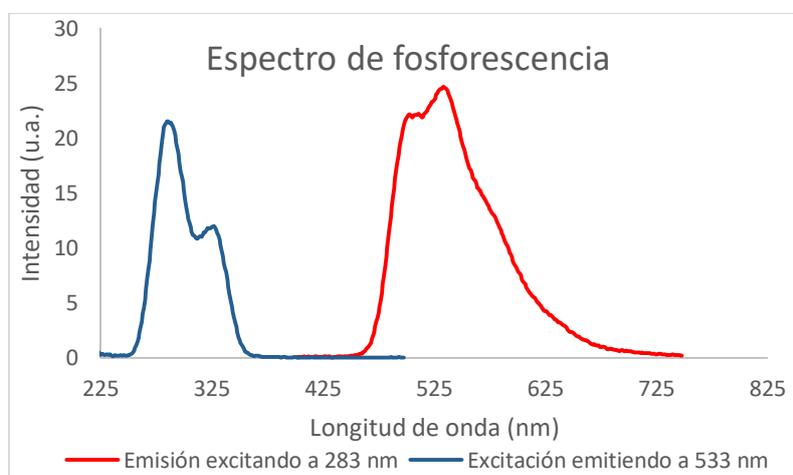


Figura 19. Espectro de emisión y excitación de fosforescencia de una disolución de nafcilina 10⁻⁵M.

Se comprueba así que la molécula es fosforescente, pero las intensidades son tan bajas que, durante el resto del estudio, se dará preferencia a la fluorescencia.

6. Caracterización de los nanomateriales

6.1. TEM

La morfología y el tamaño de las nanosferas sintetizadas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*, TEM). Este microscopio emite desde un cañón un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar, a través de un sistema de lentes electromagnéticas [52]. El haz golpea la muestra preparada (con un espesor requerido 500 a menos de 100 nm) y se transmite una parte. La parte transmitida es enfocada por la lente objetivo que crea la imagen. Esta pasa por la columna a través de lentes intermedias y del proyector, que se amplía a través de cada una de las lentes. La fuerza de la lente se puede ajustar y, en consecuencia, la ampliación se puede variar sin problema [53].

El equipo usado tiene un poder de resolución de 3,4 Å y un voltaje máximo de 200 kV.

Para el estudio, se tomó una pequeña cantidad de cada muestra sólida, como una punta de espátula, y se suspendió en etanol en un Eppendorf, con la ayuda del baño de ultrasonidos. Después, se depositó en el portamuestras y se dejó secar.

6.2. FT-IR

Se evalúan los espectros de infrarrojo de las partículas. Para ello se emplea un espectrofotómetro FTIR Varian 620-IR acoplado a un sistema de medición por reflectancia total atenuada Golden Gate equipado con un cristal de diamante. Cada espectro fue tomado desde 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y una acumulación de 16 barridos.

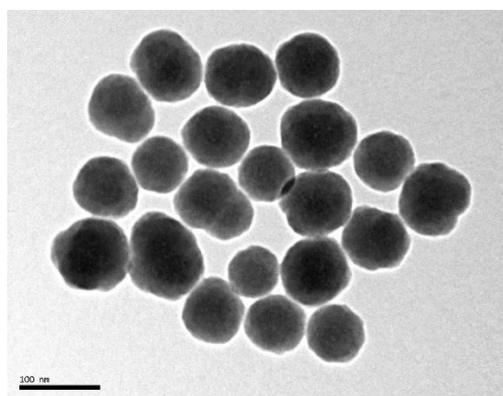
El análisis se realiza a partir del sólido directamente, sirviendo la parte más pulverizada.

IV. Discusión y resultados

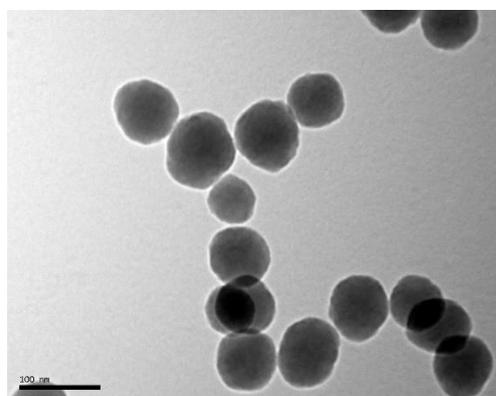
1. Caracterización de los materiales.

1.1. TEM

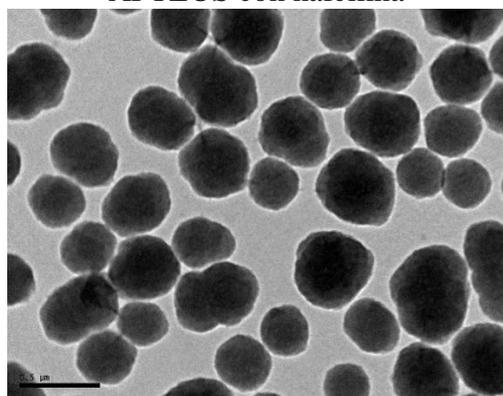
Observando las imágenes logradas con el TEM, *Figura 20 y 21*, no se encuentran grandes diferencias morfológicas entre las partículas con antibiótico y sus respectivos blancos. Todas presentan una forma esférica bastante regular e uniforme, con un tamaño medio de 79 ± 13 nm.



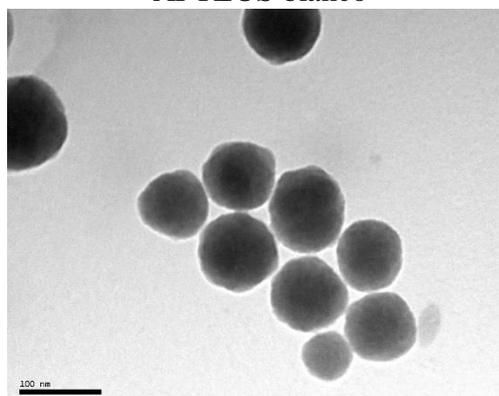
APTEOS con nafcilina



APTEOS blanco



MTEOS con nafcilina



MTEOS blanco

Figura 20. Imágenes obtenidas con el TEM de las partículas sintetizadas funcionalizadas con las distintas sílices.

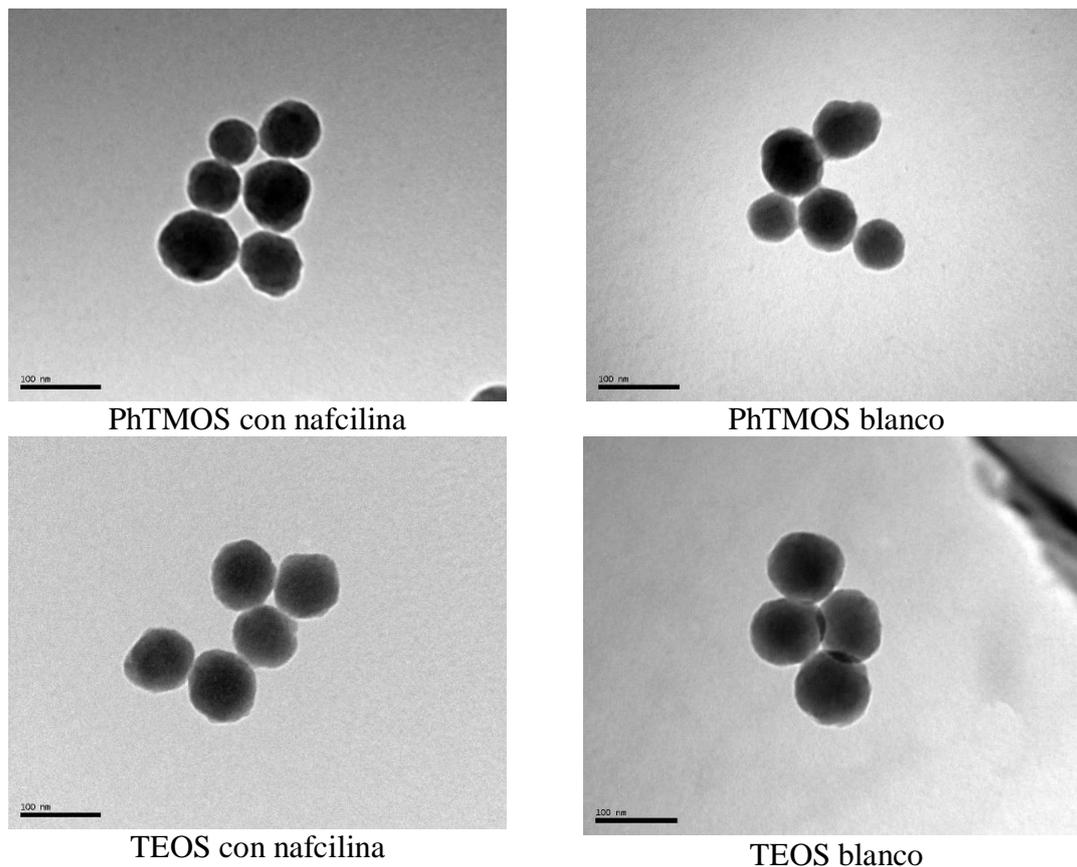


Figura 21. Imágenes obtenidas con el TEM de las partículas sintetizadas funcionalizadas con las distintas sílices.

Con la ayuda del *software* ImageJ, se midieron unas 100 nanoesferas por compuesto. La distribución de tamaño se desglosa en la Figuras 22-25. Estudiando individualmente cada uno, Tabla 3, la media de los tamaños de las partículas que tienen antibiótico y sus correspondientes blancos son similares, con excepción del MTEOS, que distan algo más sus valores, pero no hay ninguna tendencia que demuestre que la nafcilina modifique la estructura.

Compuesto	Media con antibiótico	Media blanco
APTEOS	80 ± 11	77 ± 13
MTEOS	75 ± 10	84 ± 11
PhTMOS	74 ± 11	75 ± 11
TEOS	83 ± 14	83 ± 14

Tabla 3. Medias de los tamaños de las partículas sintetizadas.

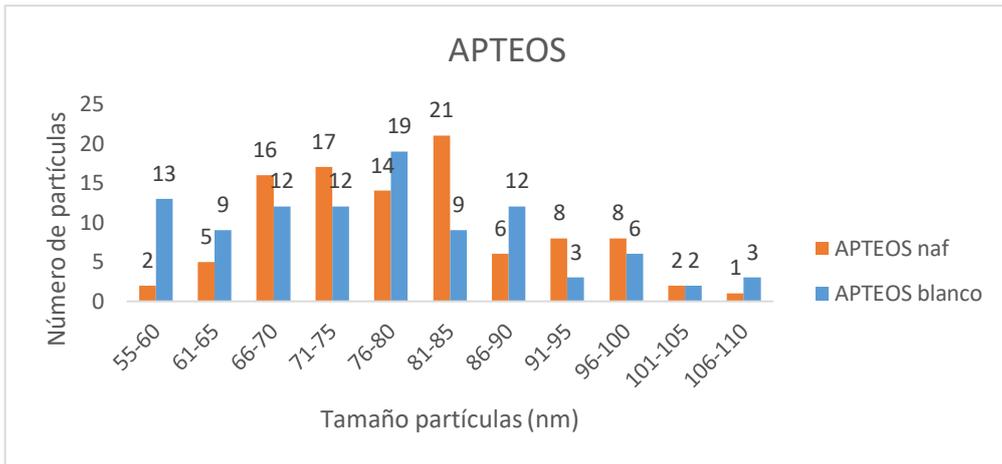


Figura 22. Distribución de tamaños de las nanosferas de APTEOS.

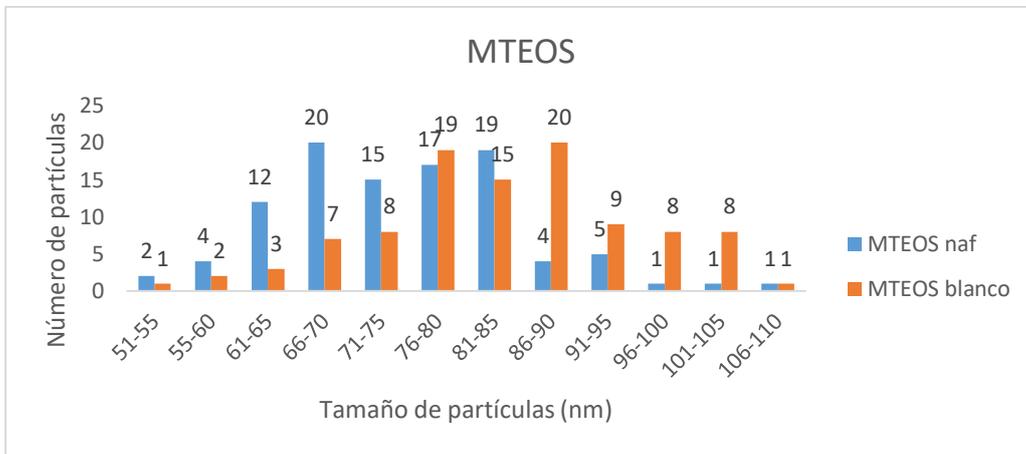


Figura 23. Distribución de tamaños de las nanosferas de MTEOS.

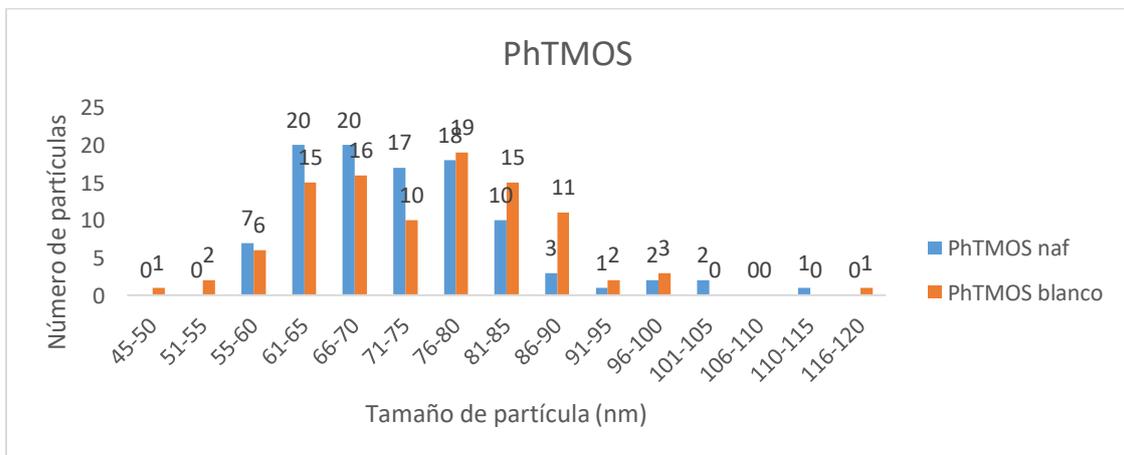


Figura 24. Distribución de tamaños de las nanosferas de PhTMOS.

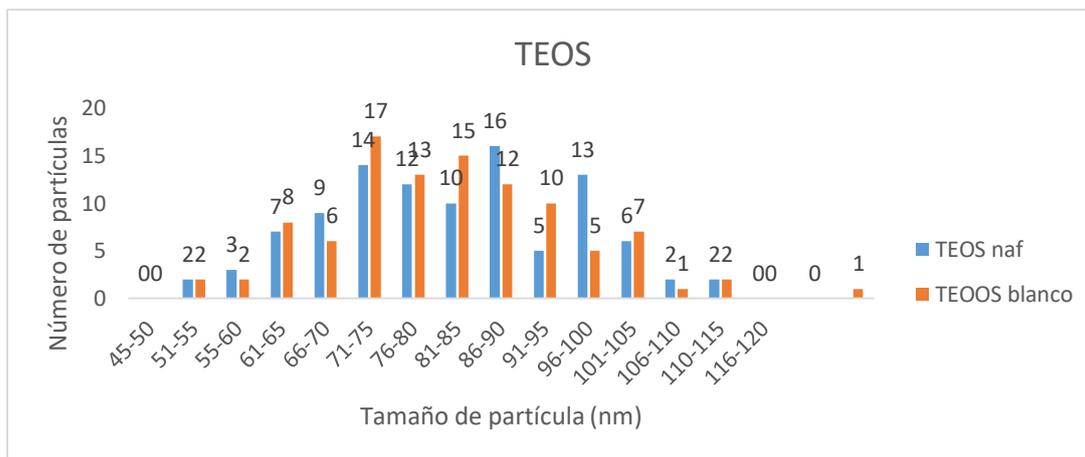


Figura 25. Distribución de tamaños de las nanosferas de TEOS.

1.2. FTIR

Para caracterizar la funcionalidad de los materiales sintetizados con los diferentes compuestos, se usa la espectroscopía de FT-IR. Los espectros obtenidos se recogen en la *Figura 26-29*. Como se puede observar, no hay diferencia entre los materiales con y sin antibiótico, no encontrando ninguna posible semejanza con el de nafcilina, *Figura 30*. Esto es probable que se debe a que el compuesto mayoritario en el producto síntesis para todos los materiales, la sílice, está en una proporción tan elevada que hace que la nafcilina sea indetectable.

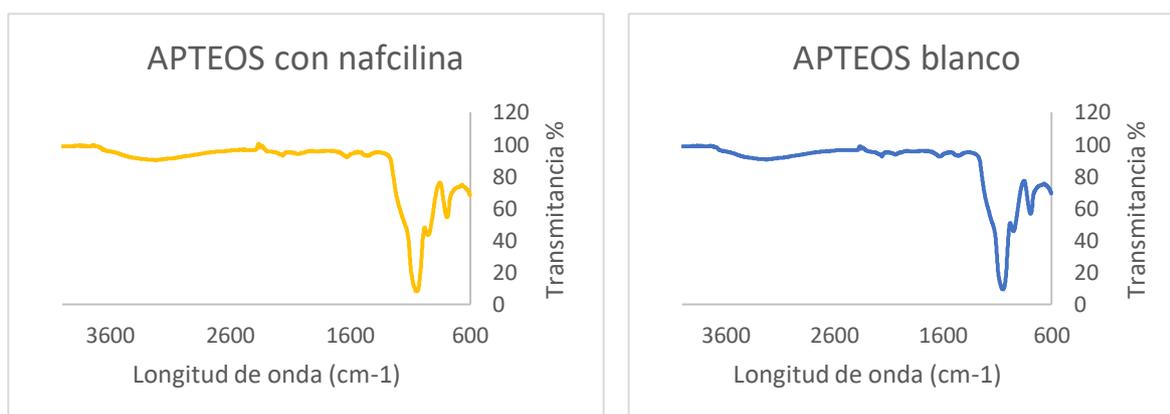


Figura 26. Espectros de FT-IR de las partículas de APTEOS con y sin antibiótico.

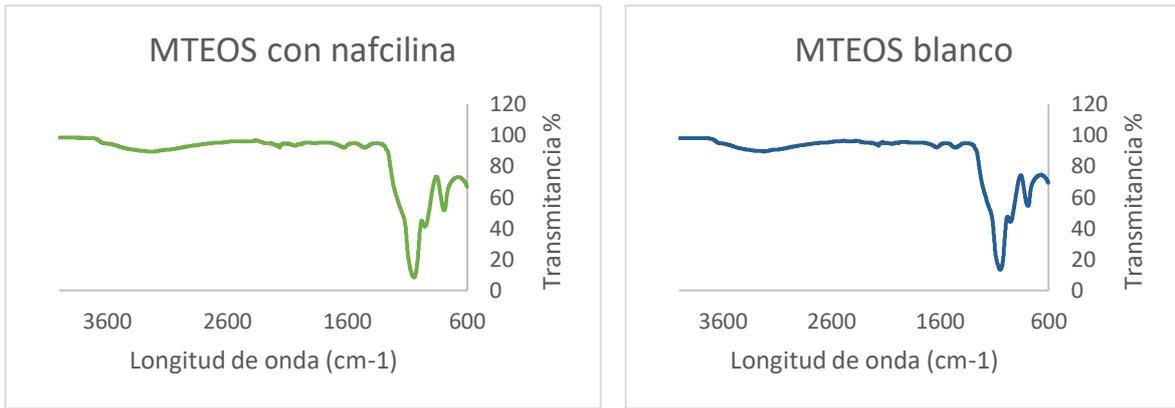


Figura 27. Espectros de FT-IR de las partículas de MTEOS con y sin antibiótico.

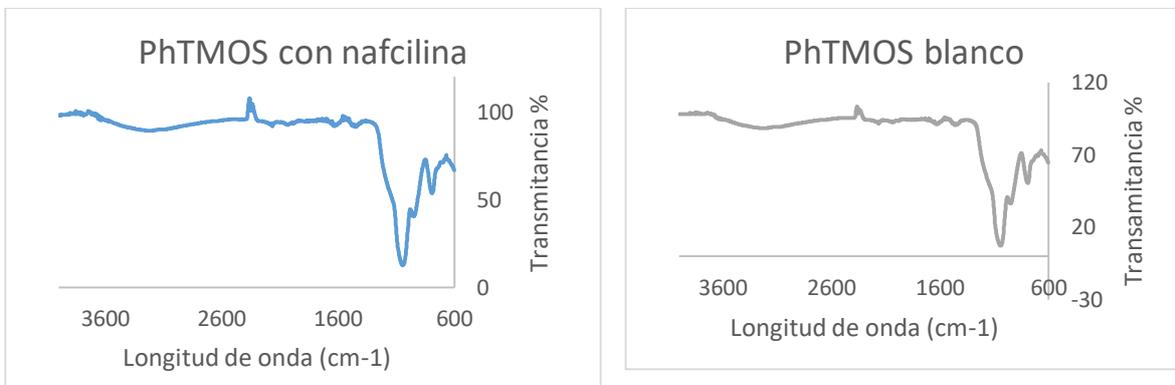


Figura 28. Espectros de FT-IR de las partículas de PhTMOS con y sin antibiótico.

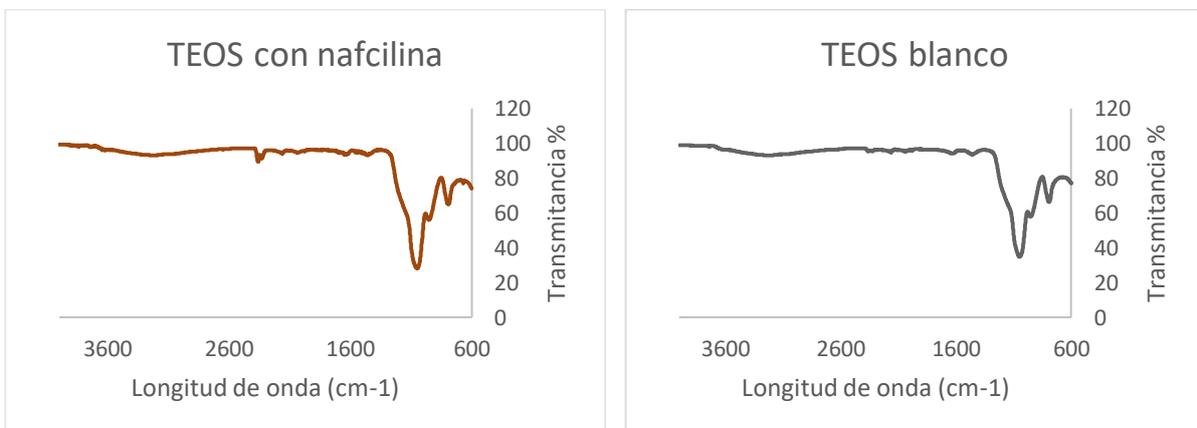


Figura 29. Espectros de FT-IR de las partículas de APTEOS con y sin antibiótico.

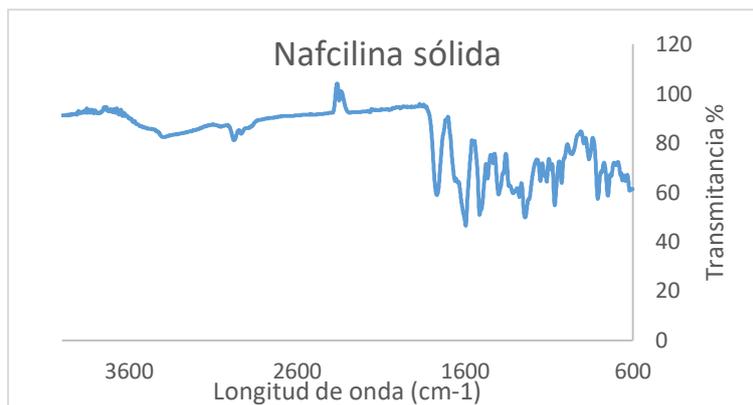


Figura 30. Espectro FT-IR de la nafcilina sólida.

Analizando la posición de las bandas de los materiales de forma teórica [51] [54], las principales están relacionadas con el estiramiento simétrico del átomo de O a lo largo de los enlaces Si-O-Si, situado en torno a 850 cm^{-1} , y al movimiento asimétrico de estiramiento en el que el O se mueve hacia atrás y hacia adelante, en una línea paralela al eje del enlace con los Si, en $1030\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$. Sobre 970 cm^{-1} , aparece un estiramiento debido al enlace Si-OH, y en torno a 780 cm^{-1} , vibraciones debido al Si-O.

Al igual que la nafcilina, tampoco se ven reflejados en el espectro ni el grupo amina del APTEOS, entre $3000\text{ y }3500\text{ cm}^{-1}$, ni el fenil de PhTMOS, entre $1400\text{ y }1600\text{ cm}^{-1}$, seguramente enmascarados por el resto de la estructura.

El pico que sale en algunos (nafcilina, T-InS, Ph-InS, Ph-BnS, A-InS) en 2330 cm^{-1} es debido a la absorción de CO_2 a la hora de realizar el espectro.

2. Experimentos de liberación de nafcilina

2.1. Medio intestinal

Las preparaciones descritas en el apartado III.3.3., se ponen en un agitador rotatorio, a 41 rpm durante varios días para estudiar la liberación del fármaco. Se medirán los sobrenadantes de los tubos a lo largo todo el proceso.

Se caracteriza la nafcilina en el medio intestinal, obteniendo finalmente 295 nm como longitud de onda de excitación, con un máximo de emisión en 357 nm, trabajando con rendijas 5-5 ya que con 10-10 saturaba. Se analiza el medio intestinal sin nafcilina, previa filtración, comprobando que éste da señal por sí mismo, y con una intensidad mayor que la disolución con el fármaco, *Figura 31*.

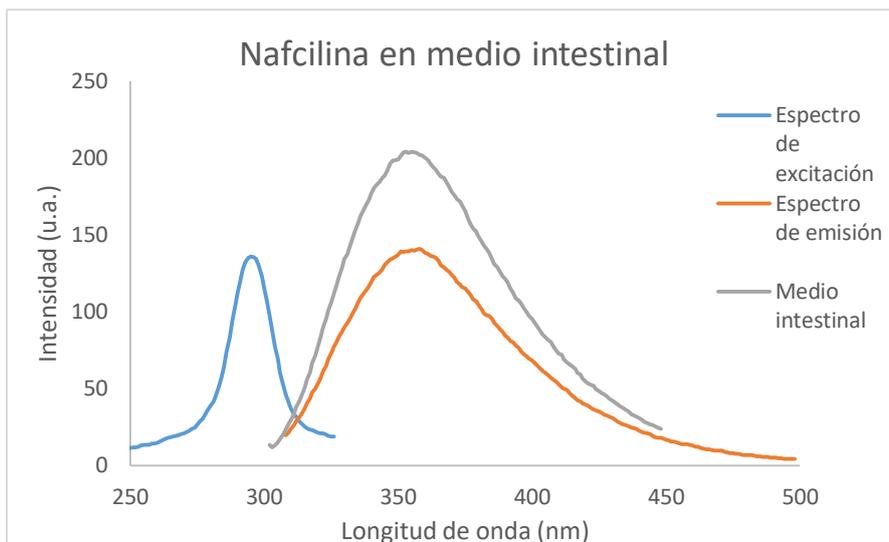


Figura 31. Espectro de fluorescencia del medio intestinal.

Se sospecha que el medio vaya a dar problemas con esta técnica, por la presencia de pancreatina. Se realizan las primeras medidas de liberación para corroborarlo y se comprueba que el blanco da más señal que el cargado con antibiótico, *Figura 32*. Es posible que la fluorescencia de alguno de los componentes de la pancreatina del medio, como la amilasa [55], enmascare la fluorescencia neta de la nafcilina. Además, la composición del medio desactiva la fluorescencia del antibiótico, lo que justifica la disminución de la intensidad de fluorescencia.

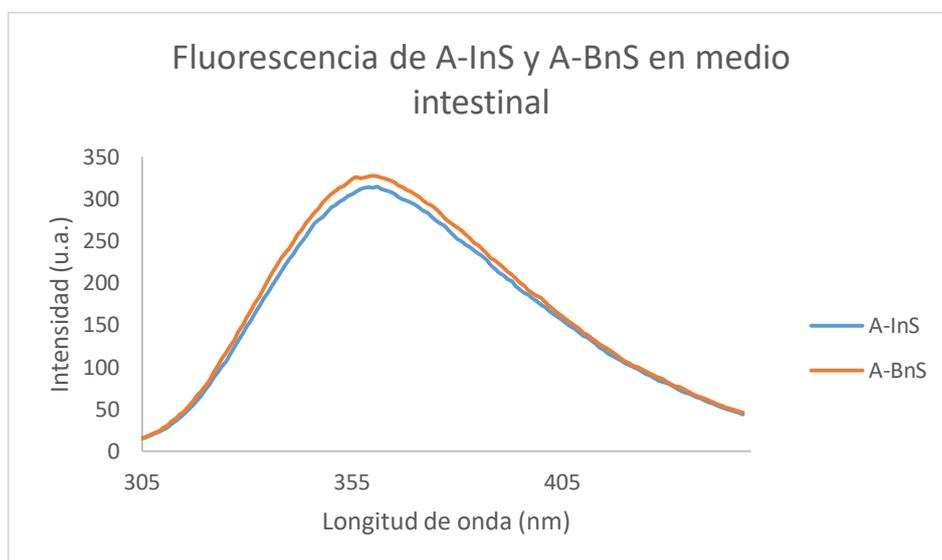


Figura 32. APTEOS en medio intestinal.

Pese a las dificultades encontradas, se intenta determinar la nafcilina liberada por los materiales A-InS y A-BnS en el medio intestinal mediante fluorescencia, obteniendo espectros como los indicados en la *Figura 32*. Vistos los pobres resultados obtenidos, y dado que el medio intestinal

presenta una absorbancia muy alta en la misma zona del espectro en que absorbe la nafcilina, se intenta como alternativa la fosforescencia a temperatura ambiente, previamente descrita.

Para ello, se prepara una disolución con 2832 μL del medio intestinal, con 2400 μL de KI 3M, 155 μL de Na_2SO_3 0,1 M y 4153 μL de PBS 0,1 M con pH 7,4, obteniendo una intensidad de señal inferior a 0,2, por lo cual se decide descartar esta técnica.

Dadas las dificultades presentes para la determinación de nafcilina en medio intestinal, y siendo el objetivo fundamental del trabajo el estudio de la liberación controlada del fármaco y no la puesta a punto de un método de determinación de nafcilina en medio intestinal, se decide centrar el trabajo únicamente en la liberación en medio gástrico.

2.2. Medio gástrico

2.2.1. Tubos con 250 mg de compuesto

Igual que en el medio intestinal, las preparaciones descritas en el apartado III.3.3. se ponen en un agitador rotatorio y comienza el estudio de liberación. Se realizan las medidas de los sobrenadantes a lo largo de tres semanas. Las concentraciones de nafcilina medidas en cada tubo se presentan en la *Figura 33*.

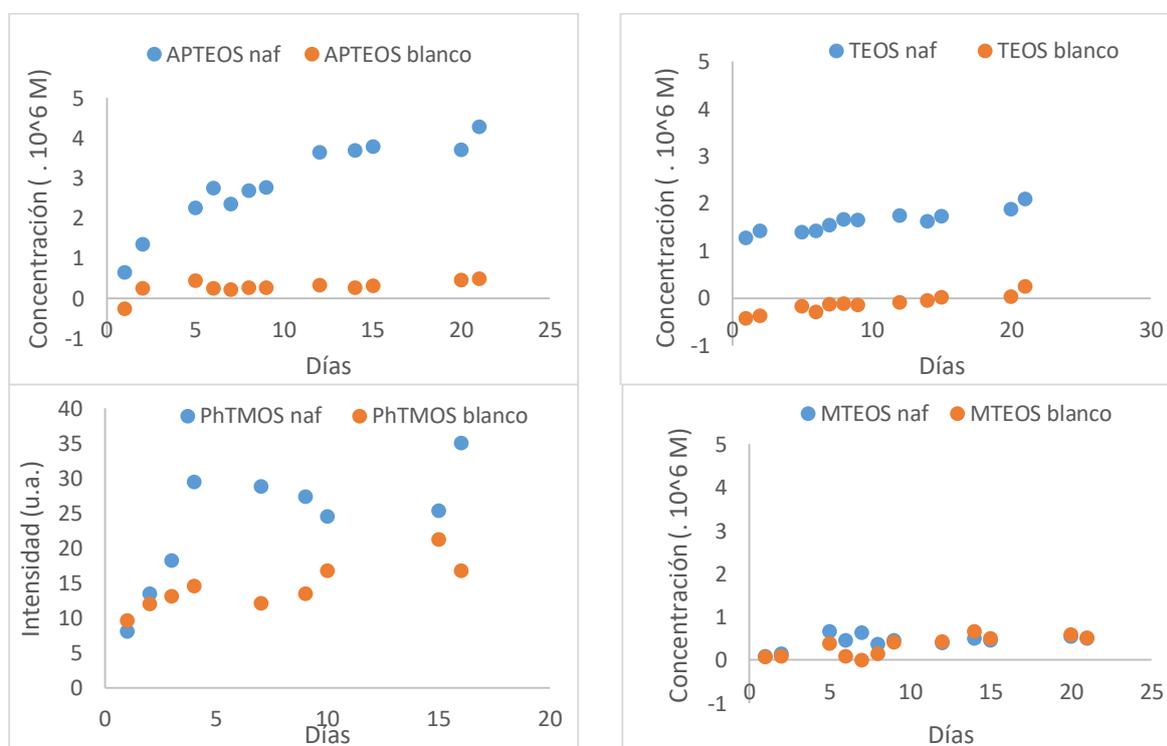


Figura 33. Gráficos de la liberación de nafcilina por día en cada uno de los materiales sintetizados.

Estudiando los gráficos, se aprecian grandes diferencias entre los compuestos. La concentración de nafcilina presente en el sobrenadante del ensayo de liberación de A-InS es creciente a lo largo del ensayo. Un comportamiento parcialmente similar es el del material basado en TEOS, aunque en este caso la concentración de nafcilina resulta más baja y aproximadamente constante a lo largo del ensayo. En cambio, las mediciones para el M-BnS y M-InS son totalmente irregulares y aleatorias, con concentraciones que, en muchos casos, son inferiores al límite de detección. Por otro lado, pese a que la pareja de materiales Ph-InS / Ph-BnS presentan todos los días una concentración inferior al límite de detección, por lo cual se representa la intensidad, la concentración de nafcilina liberada aparenta tener una tendencia creciente. Esta disparidad en los resultados está relacionada con los grupos químicos presentes en la superficie de los distintos materiales, que interactúan con el antibiótico afectando su lixiviación del material.

Las A-InS, recubiertas con APTEOS, presentan grupos amino en su superficie, lo que genera un entorno hidrofílico y con capacidad para formar enlaces de hidrógeno con el medio que compitan con la nafcilina, reteniéndola menos y liberándola más.

Las T-InS, recubiertas con el mismo TEOS empleado para constituir el núcleo de las partículas, por otro lado, solo presenta la estructura de la propia sílice, con una interacción pobre con la nafcilina, liberándola rápidamente, estando prácticamente la totalidad de ella en disolución casi desde el principio.

Las Ph-InS presentan un grupo aromático en la cadena lateral que puede interactuar fácilmente con el naftaleno de la nafcilina mediante interacciones de tipo π - π *stacking*. Estas interacciones pueden retener fuertemente a la nafcilina, haciendo que se libere muy lentamente o incluso que no se libere.

Las M-InS presentan un comportamiento difícil de explicar. Considerando que la superficie está modificada únicamente por la presencia de algunos grupos metilo, a priori se esperaría un comportamiento similar al obtenido en T-InS, con una retención ligeramente mayor por la mayor hidrofobicidad de la superficie. Los resultados obtenidos, en que la nafcilina queda completamente retenida por el material, requieren un estudio más detallado que se encuentra fuera del alcance del presente trabajo fin de master (TFM).

2.2.2. Tubos con 500 mg de compuesto.

Con objeto de obtener mayores concentraciones de nafcilina en el sobrenadante que permitieran mejorar la calidad de los resultados obtenidos, se decidió repetir la experiencia de liberación empleando una mayor concentración de material en un menor volumen de medio de liberación, de forma que la concentración de nafcilina en medio gástrico fuera mayor. Se prepararon los tubos como se explica en el apartado III.3.3., y se pusieron a rotar en el agitador. Las concentraciones de nafcilina medidas en cada tubo se presentan en la *Figura 34*.

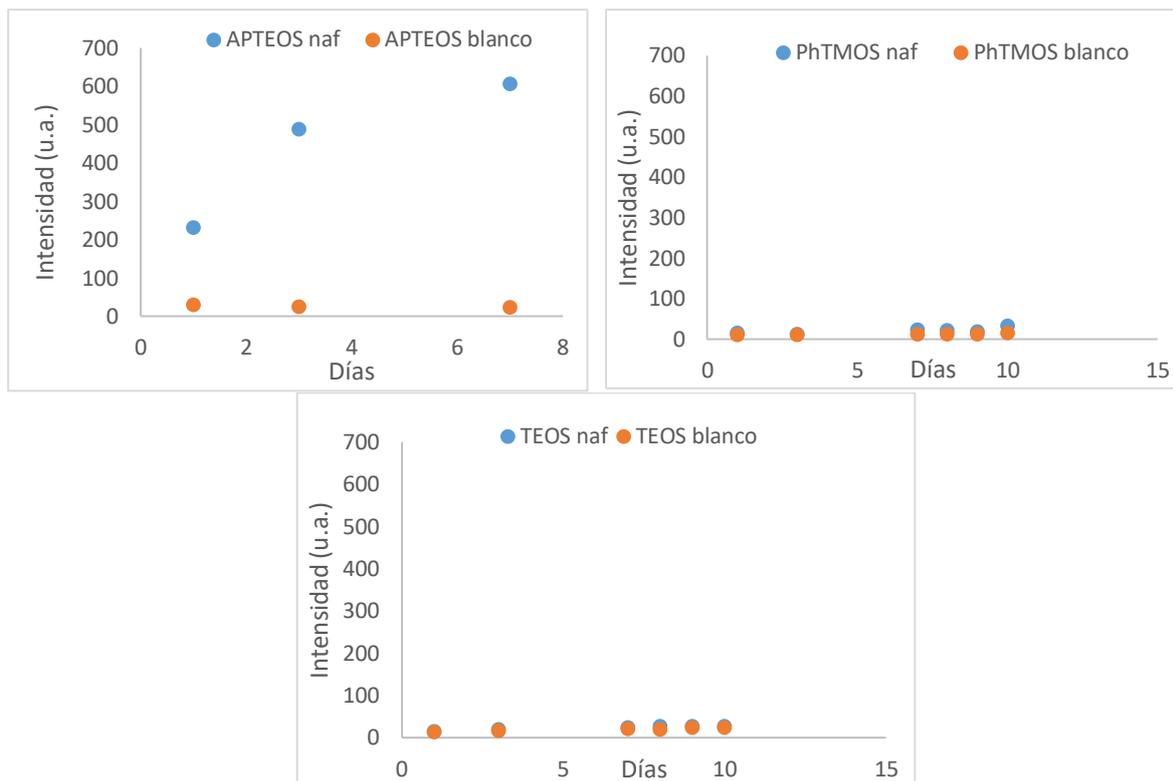


Figura 34. Gráficos de la liberación de nafcilina por días en los materiales sintetizados.

En este ensayo, las M-InS y las M-BnS no pudieron separarse por centrifugación del medio gástrico, ni siquiera aumentando el tiempo de centrifugación a 3 horas. Dada la imposibilidad material, no se pudo hacer un seguimiento de la nafcilina liberada. Este hecho se puede relacionar con lo hallado en la primera prueba, sugiriendo que la propia naturaleza del material obtenido no es comparable a la de los otros materiales sintetizados.

Por otro lado, la señal de la nafcilina liberada por A-InS aumenta progresivamente, llegando a un punto en el que se acaba saliendo del intervalo dinámico lineal del método fluorescente, no pudiendo cuantificarla. Esto es coherente con los resultados recabados del primer ensayo, donde las A-InS son también las que mayor concentración de nafcilina presentan en la liberación.

Contrariamente a lo esperado, las T-InS no mejoran su liberación. Aunque tienen una tendencia similar a la observada en el experimento anterior, la concentración de nafcilina liberada está por debajo del límite de detección.

En el caso del Ph-InS los resultados son similares a los obtenidos en el caso anterior, sugiriendo que incluso en estas condiciones la retención ejercida por los grupos bencénicos sobre la nafcilina es muy grande. No obstante, se percibe una ligera tendencia al aumento de la señal de la nafcilina con el tiempo de liberación.

2.2.3. Ensayos de liberación por agitación magnética

Se quiere probar una liberación aún más concentrada y en un periodo corto de tiempo con los dos materiales que produjeron mejores resultados: A-InS y T-InS. Para ello, directamente en

una cubeta se pesan 250 mg del compuesto que se desea monitorizar y se añaden 2,5 mL de medio gástrico. Se introduce un imán en el interior de la cubeta y se emplea un portamuestras que permite la agitación magnética a la vez que se mide fluorescencia. La muestra se mantiene en agitación durante 10 minutos, y se detiene dejando reposar al sistema 1 minuto antes de tomar un espectro de emisión. El experimento se finaliza cuando la intensidad de fluorescencia permanece constante con el tiempo.

Los resultados obtenidos se recogen en la *Figura 35*.

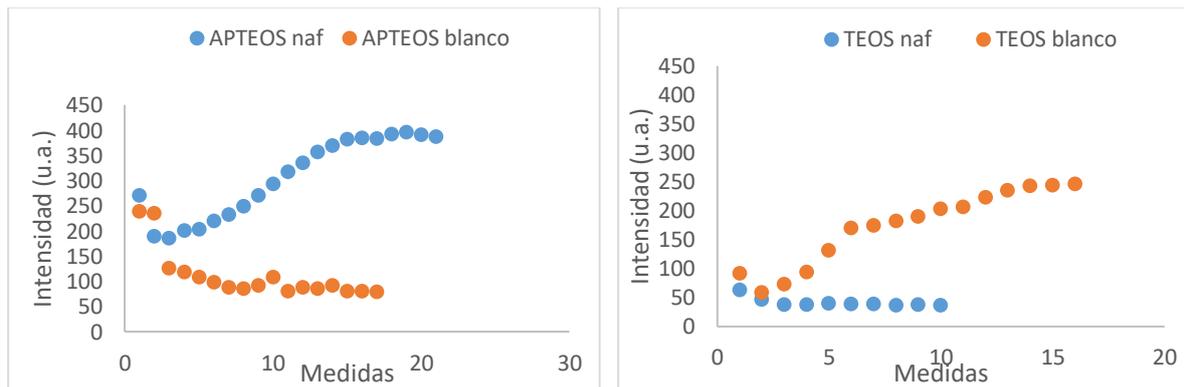


Figura 35. Gráficos de la liberación de la nafcilina en el APTEOS y en TEOS mediante agitación, medido por fluorescencia.

El ensayo duró aproximadamente cuatro horas para los materiales recubiertos con APTEOS y 3 para los recubiertos con TEOS. En este caso, se observa que el material T-BnS produce una señal de fluorescencia superior al T-InS, sugiriendo que libera más nafcilina el material que no la contiene que el que sí. Esta contradicción está en línea con los resultados inesperados obtenidos en los experimentos en que se utilizó una mayor cantidad de material sólido. Una posible explicación es que el material haya retenido parte de los estabilizantes que contiene el reactivo TEOS y cuya liberación se aprecia en los sistemas que tienen una mayor proporción de sólido/medio. Además, en el caso particular de las medidas a tiempos cortos realizadas directamente en la cubeta, puede que el tiempo que se deja de reposo al sistema entre el fin de la agitación y la medida no sea suficiente y se generen problemas de dispersión de luz que falseen el espectro.

Los resultados del material recubierto con APTEOS son los esperados. Las primeras medidas, tanto en el blanco como en el cargado son un poco más altas debido al ruido del sistema. Conforme pasa el tiempo, el blanco permanece más o menos estable y el que contiene la nafcilina va aumentando progresivamente hasta que se estabiliza.

V. Conclusiones

- Se sintetizaron nanopartículas esféricas cargadas con nafcilina recubiertas con cuatro precursores diferentes: TEOS, APTEOS, MTEOS y PhTMOS. Se alteró el orden de incorporación del fármaco, añadiéndolo en la superficie funcionalizada.
- Los materiales obtenidos presentan una forma esférica regular y con un tamaño medio de 79 ± 13 nm, ligeramente más pequeñas que las de la bibliografía seguida. No se aprecia una gran diferencia morfológica entre los cargados con antibiótico y los blancos. Estos también se analizaron por FT-IR, encontrando que la estructura silícea enmascara el resto de componentes, resultando que tampoco haya diferencias entre los espectros, ni se observe la presencia de la nafcilina debido a su baja concentración.
- Se ensayaron tres métodos espectrofotométricos: absorción ultravioleta-visible, fosforescencia a temperatura ambiente y fluorescencia, resultando ser este último el más indicado, con un límite de detección del orden de 10^{-7} M.
- Se plantearon ensayos de liberación en dos medios: gástrico e intestinal. El medio intestinal era incompatible con los sistemas de medida propuestos.
- Los experimentos en medio gástrico demostraron que las nanopartículas recubiertas con 3-aminopropiltrietoxisilano liberan el antibiótico de forma regular, siendo las que mostraron un comportamiento mejor. Las nanopartículas recubiertas con tetraetoxisilano mostraron resultados positivos, únicamente cuando se emplean en baja proporción con respecto al medio de liberación.
- Las nanopartículas recubiertas con metiltrietoxisilano presentan unas características físicas que las hacen difícilmente separables del medio gástrico por centrifugación, por lo que no se pueden obtener resultados concluyentes.
- Las nanopartículas recubiertas con feniltrimetoxisilano muestran una elevada retención del antibiótico, probablemente como consecuencia de la interacción entre los grupos fenilo presentes en la superficie de las nanopartículas con los grupos naftilo del antibiótico.

VI. Bibliografía

- [1] C. Avedaño, *Introducción a la química farmacéutica*, 2^a ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, 1993.
- [2] F. Paredes y J. J. Roca, “Acción de los antibióticos,” *Ámbito Farm. Farmacol.*, vol. 23, no. 3, pp. 116–124, 2004.
- [3] J. Florez, *Farmacología Humana*, 3^a ed. Barcelona: Masson, 1997.
- [4] S. Wetzel, H. Lachance, and H. Waldmann, “Natural Products as Lead Sources for Drug Development,” in *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 2010, pp. 5–46.
- [5] M. J. Fresnadillo Martínez, M. I. García García, E. García Sánchez, y J. E. García Sánchez, “Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 28, no. SUPPL. 2, pp. 53–64, 2010.
- [6] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, R. J. Flower, y G. Henderson, *Farmacología*, 7^a ed. Barcelona: Elsevier, 2012.
- [7] S. S. Castle, “Nafcillin,” in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007, pp. 1–4.
- [8] R. Yogev, E. Burkholder, and A. T. Davis, “Synergistic action of ampicillin and nafcillin against ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 17, no. 3, pp. 461–463, 1980.
- [9] R. O. Bonow *et al.*, “ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 114, no. 5, pp. 84–231, 2006.
- [10] N. Y. Shpigel, P. H. Kass, and A. Saran, “A comparative randomized field trial on intramammary and intramuscular dry cow antibiotic treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows,” *J. Vet. Med. Ser. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, vol. 53, no. 8, pp. 418–422, 2006.
- [11] E. G. C. Chad A. Knoderer, Jennifer L. Morris, “Case Report Continuous Infusion of Nafcillin for Sternal Osteomyelitis in an Infant,” *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.*, vol. 15, no. 1, pp. 49–54, 2010.
- [12] J. G. Vallejo, A. N. Cain, E. O. Mason, S. L. Kaplan, and K. G. Hultén, “*Staphylococcus aureus* Central Nervous System Infections in Children,” *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 36, no. 10, pp. 947–951, 2017.
- [13] Y. Doi and H. F. Chambers, “Penicillins and β -Lactamase Inhibitors,” in *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed., vol. 1, Elsevier, 2014, pp. 263–277.
- [14] J. A. Murillo Pulgarín, A. A. Molina, and M. T. Alañón Pardo, “Determination of nafcillin by room temperature phosphorescence,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 423, no. 1, pp. 85–93, 2000.
- [15] A. Fernández-González, R. Badía, and M. E. Díaz-García, “Sensitive flow-injection system for nafcillin determination based on non-protected room temperature phosphorescence,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 498, no. 1–2, pp. 69–77, 2003.

- [16] L. C. Guardia, “Tecnología de impresión molecular. Xero-geles nanoestructurados para el reconocimiento de nafcilina.,” Universidad de Oviedo, 2008.
- [17] K. K. Jain, “Drug Delivery Systems. Current Status and Future Prospects of Drug Delivery Systems,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1141, Springer, 2014, pp. 1–56.
- [18] F. Chaubet, V. Rodriguez-Ruiz, M. Boissière, and D. Velasquez, “Pharmacology: Drug Delivery,” in *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, Elsevier, 2017, pp. 440–453.
- [19] M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, “Mesoporous Materials for Drug Delivery,” *Aangewandte Chemie Int. Ed.*, vol. 46, no. 40, pp. 7548–7558, 2007.
- [20] M. Shahriari, M. Zahiri, K. Abnous, S. M. Taghdisi, M. Ramezani, and M. Alibolandi, “Enzyme responsive drug delivery systems in cancer treatment,” *J. Control. Release*, 2019.
- Accepted Manuscript. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.004>
- [21] H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, and W. Wu, “Adapting liposomes for oral drug delivery,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 9, no. 1, pp. 36–48, 2019.
- [22] K. Maso, I. Monia Montagner, A. Grigoletto, O. Schiavon, A. Rosato, and G. Pasut, “A Non-Covalent Antibody Complex for the Delivery of anti-cancer drugs,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 142, pp. 49–60, 2019.
- [23] K. Fuchs, R. Duran, A. Denys, P. E. Bize, G. Borchard, and O. Jordan, “Drug-eluting embolic microspheres for local drug delivery – State of the art,” *J. Control. Release*, vol. 262, pp. 127–138, 2017.
- [24] V. Gugleva, S. Titeva, S. Rangelov, and D. Momekova, “Design and in vitro evaluation of doxycycline hyclate niosomes as a potential ocular delivery system,” *Int. J. Pharm.*, vol. 567, Aug. 2019.
- Accepted Manuscript. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.06.022>
- [25] P. Luliński, “Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: A way to application in modern pharmacotherapy. A review,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1344–1353, 2017.
- [26] C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, “Molecularly imprinted polymers for drug delivery,” *J. Chromatogr. B*, vol. 804, no. 1, pp. 231–245, 2004.
- [27] D. Cunliffe, A. Kirby, and C. Alexander, “Molecularly imprinted drug delivery systems,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 12, pp. 1836–1853, 2005.
- [28] L. M. Madikizela, S. Ncube, and L. Chimuka, “Green chemistry features in molecularly imprinted polymers preparation process,” in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2019.
- [29] M. Włoch and J. Datta, “Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers,” in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2019.
- [30] L. I. Andersson, “Selective solid-phase extraction of bio- And environmental samples using molecularly imprinted polymers,” *Bioseparation*, vol. 10, no. 6, pp. 353–364, 2001.

- [31] K. Haupt and K. Mosbach, "Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors," *Chem. Rev.*, vol. 100, no. 7, pp. 2495–2504, 2000.
- [32] G. Wulff, "Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers," *Chem. Rev.*, vol. 102, no. 1, pp. 1–28, 2002.
- [33] L. Ye and K. Mosbach, "Polymers recognizing biomolecules based on a combination of molecular imprinting and proximity scintillation: A new sensor concept," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 12, pp. 2901–2902, 2001.
- [34] R. Zanella, "Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño," *Mundo Nano*, vol. 5, no. 1, pp. 69–81, 2005.
- [35] M. E. Díaz-García and R. B. Laíño, "Molecular imprinting in sol-gel materials: Recent developments and applications," *Microchim. Acta*, vol. 149, no. 1, pp. 19–36, 2005.
- [36] A. Mujahid, P. A. Lieberzeit, and F. L. Dickert, "Chemical sensors based on molecularly imprinted sol-gel materials," *Materials (Basel)*, vol. 3, pp. 2196–2217, 2010.
- [37] L. Hernández Hernández y C. González Pérez, *Introducción al análisis instrumental*. Barcelona: Ariel Ciencia, 2002.
- [38] E. D. Olsen, *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona: Editorial Reverté, 1986.
- [39] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, 6^a ed. México, D.F.: Cengage Learning, 2008.
- [40] M. N. Pons *et al.*, "Nitrates monitoring by UV–vis spectral analysis," *Ecohydrol. Hydrobiol.*, vol. 17, pp. 46–52, 2017.
- [41] N. Pourreza, S. Rastegarzadeh, and A. Larki, "Determination of fungicide carbendazim in water and soil samples using dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume UV-vis spectrophotometry," *Talanta*, vol. 134, pp. 24–29, 2015.
- [42] S. Andris, M. Rüdte, J. Rogalla, M. Wendeler, and J. Hubbuch, "Monitoring of antibody-drug conjugation reactions with UV/Vis spectroscopy," *J. Biotechnol.*, vol. 288, pp. 15–22, 2018.
- [43] A. Dankowska, A. Domagała, and W. Kowalewski, "Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies," *Talanta*, vol. 172, pp. 215–220, 2017.
- [44] Y. Du *et al.*, "Determination of iron(III) based on the fluorescence quenching of rhodamine B derivative," *Talanta*, vol. 106, pp. 261–265, 2013.
- [45] Y. Xie, B. Li, L. Liu, J. Ouyang, and Y. Wu, "Rapid screening of mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) in grains by fluorescence spectroscopy," *Food Chem.*, vol. 294, pp. 458–467, 2019.
- [46] E. R. Menzel, "Detection of Latent Fingerprints by Laser-Excited Luminescence," *Anal. Chem.*, vol. 61, no. 8, pp. 557–561, 1989.
- [47] E. Linde and M. C. Celina, "IR spectroscopic quantification of small molecule transport and desorption phenomena in polymers," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 162, pp. 213–223, 2019.

- [48] M. Jackson, G. Wagnieres, and H. H. Mantsch, "IR, Medical Science Applications," in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 3rd ed., Elsevier, 2016, pp. 479–487.
- [49] A. S. Gilbert and R. W. Lancaster, "IR and Raman Spectroscopy, Industrial Applications," in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 3rd ed., Elsevier, 2016, pp. 394–407.
- [50] "Recommendations of methods to dosage forms testing," *Eur. Pharmacopoeia 8.0.*, vol. 5.17.1, pp. 727–729.
- [51] T. Lopez, M. A. Francos, A. Gonzalez, M. E. Diaz-Garcia, and R. Badia-Laino, "Controlled Release of Nafcillin Using Biocompatible 'Dummy' Molecularly Imprinted Sol-Gel Nanospheres," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15, no. 3, pp. 262–270, 2015.
- [52] R. Marassi and F. Nobili, "Structural and Chemical Properties: Transmission Electron Microscopy," in *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, J. Garche, Ed. Elsevier, 2009, pp. 769–789.
- [53] B. Kwiecińska, S. Pusz, and B. J. Valentine, "Application of electron microscopy TEM and SEM for analysis of coals, organic-rich shales and carbonaceous matter," *Int. J. Coal Geol.*, vol. 211, 2019.
- Accepted Manuscript. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coal.2019.05.010>
- [54] J. González-Hernández y J. F. Pérez-Robles, "Vidrios SiO₂ nanocompuestos preparados por sol-gel : revisión," *Superf. y Vacío*, vol. 11, pp. 1–16, 2000.
- [55] B. S. Khade, V. L. Mathe, and P. M. Dongre, "α-amylase binding to thermal plasma synthesized zinc oxide nanosheets: A fluorescence study," *J. Lumin.*, vol. 187, pp. 449–456, 2017.

ANEXO

1. Estructura precursores

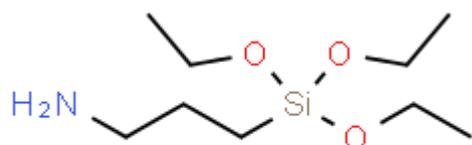


Figura 36. Estructura APTEOS

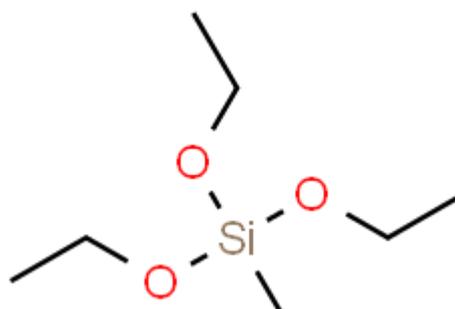


Figura 37. Estructura MTEOS

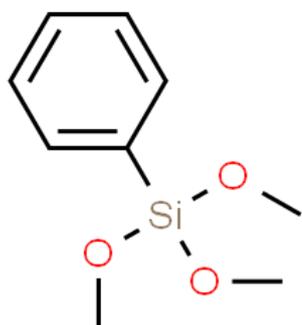


Figura 38. Estructura PhTMOS.

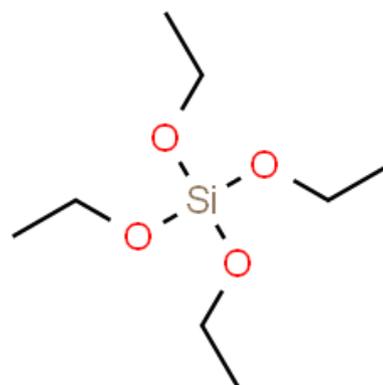


Figura 39. Estructura TEOS