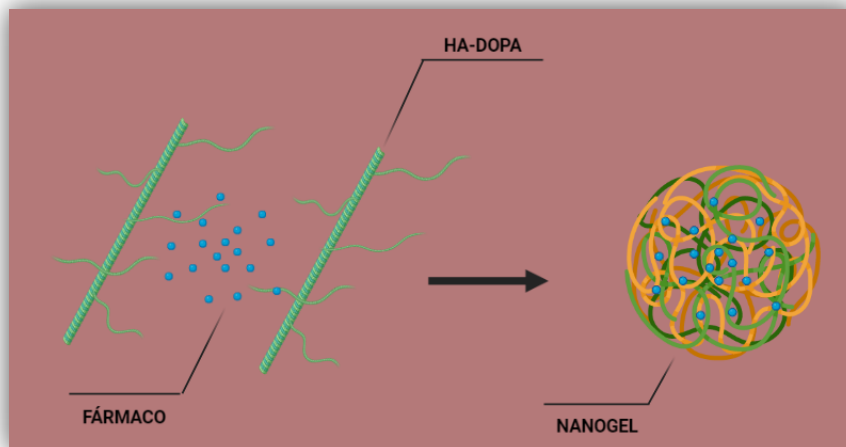




GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

TRABAJO FINAL DE GRADO

NANOGELES PARA APLICACIONES OFTALMOLÓGICAS



WILBERT ESQUIVEL VALENCIA

PROF. TZANKO TZANOV
PROF. ESTER GUAUS
DRA. SILVIA PEREZ
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

23/06/2021



GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

El Sr. Tzanko Tzanov y la Sra. Silvia Pérez como director y tutora de este trabajo.

Certifican,

Que el estudiante Wilbert Esquivel Valencia ha realizado el proyecto *Nanogeles para aplicaciones oftalmológicas*, que se recoge en esta memoria para optar al título de grado en Óptica y Optometría.

Y para que consten firman este certificado.

Prof. Tzanko Tzanov
Director/a del Trabajo

Prof. Ester Gaus
Director/ del trabajo

Sra. Silvia Pérez
Tutora



GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

NANOGELES PARA APLICACIONES OFTALMOLÓGICAS

RESUMEN

La administración de fármacos en el ojo es un proceso complejo, ya que este puede presentar inconvenientes como barreras tisulares, el parpadeo o el sistema de drenaje naso-lacrimal. En definitiva, son procesos fisiológicos que no pueden ser evitados, por lo que se tendrá que encontrar un fármaco y una vía de administración ideal para solucionar estos inconvenientes. En el ámbito de la oftalmología hay diversas vías de administración de fármacos, entre ellas, tópica, sub-conjuntival, supracoroidal, intravítrea, endovenosa y oral. En la vía tópica es muy común que se administren fármacos en estado de gel. Por otro lado, los hidrogeles se describen como redes poliméricas hidrófilas que se caracterizan por tener textura blanda, ser porosos y por tener un elevado contenido en agua y por ello, se considera como un material idóneo para transportar sustancias, ya que en su proceso de formación puede ser aprovechado para encapsular sustancias. Si se habla a nivel nanométrico, hay actualmente mucha ambición en la comunidad científica en diseñar nanogeles con una amplia variedad estructural con el fin de innovar y mejorar la forma en la que se administran los fármacos en el cuerpo humano, y en este caso, en el ojo.

En este trabajo, se pretende sintetizar un nanogel de ácido hialurónico y dopamina como plataforma para encapsular, transportar y liberar agentes terapéuticos y fármacos para aplicaciones oftalmológicas. El ácido hialurónico es un biopolímero biocompatible con el ojo, ya que este puede encontrarse en distintas estructuras oculares tales como el humor acuoso y la lágrima. Además, es un compuesto muy usado en oftalmología para la humectación de la córnea y la estabilidad de la película lagrimal. Para la preparación de los nanogeles se utilizó ácido hialurónico modificado con dopamina, un compuesto fenólico natural con propiedades antioxidantes, con el método de la desolvatación. Una vez formadas las nanopartículas, mediante la acción la enzima lacasa se inició una reacción entre las moléculas de dopamina conjugadas en el polímero para crear una red que estabiliza la estructura de las nanopartículas. La metodología se aplicó para la encapsulación de diferentes fármacos como diclofenaco (antiinflamatorio y analgésico), gentamicina (bactericida) y quercetina (antioxidante). Los resultados obtenidos indican que los nanogeles tienen propiedades antioxidantes y son biocompatibles, además de servir como plataforma para encapsular diferentes compuestos terapéuticos. A pesar de la necesidad de un análisis más amplio sobre las propiedades de estas nanopartículas, el presente estudio sienta las bases para la preparación de nanogeles con un gran potencial para aplicaciones oftalmológicas como gotas, recubrimiento de lentes o incluso formuladas en pomadas.



GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

NANOGELES PARA APLICACIONES OFTALMÓLOGICAS

RESUM

L'administració de fàrmacs a l'ull és un procés complex, ja que aquest pot presentar inconvenients com barreres tissulars, el parpelleig o el sistema de drenatge nasolacrimal. En definitiva, són processos fisiològics que no poden ser evitats, per la qual cosa haurà de trobar un fàrmac i una via d'administració ideal per solucionar aquests inconvenients. En l'àmbit de l'oftalmologia hi ha diverses vies d'administració de fàrmacs, entre elles, tòpica, sub-conjuntival, supracoroidal, intravítrea, endovenosa i oral. A la via tòpica és molt comú que s'administrin fàrmacs en estat de gel. Per altra banda, els hidrogels es descriuen com xarxes polimèriques hidrofíliques que es caracteritzen per tenir textura tova, ser porosos i per tenir un elevat contingut en aigua i per això, es considera com un material idoni per a transportar substàncies, ja que en el seu procés de formació pot ser aprofitat per encapsular substàncies. Si es parla a nivell nanomètric, hi ha actualment molta ambició en la comunitat científica a dissenyar nanogels amb una àmplia varietat estructural per tal d'innovar i millorar la forma en què s'administren els fàrmacs en el cos humà, i en aquest cas, en l'ull. En aquest treball, es pretén sintetitzar un nanogel d'àcid hialurònic i dopamina com a plataforma per encapsular, transportar i alliberar agents terapèutics i fàrmacs per a aplicacions oftalmològiques. L'àcid hialurònic és un biopolímer biocompatible amb l'ull, ja que aquest pot trobar-se en diferents estructures oculars com ara l'humor aquós i la llàgrima. A més, és un compost molt utilitzat en oftalmologia per a la humectació de la còrnia i l'estabilitat de la pel·lícula lacrimal. Per a la preparació dels nanogels es va utilitzar àcid hialurònic modificat amb dopamina, un compost fenòlic natural amb propietats antioxidants, amb el mètode de la desolvatació. Un cop formades les nanopartícules, mitjançant l'acció l'enzim lacasa es va iniciar una reacció entre les molècules de dopamina conjugades en el polímer per crear una xarxa que estabilitza l'estructura de les nanopartícules. La metodologia es va aplicar la per encapsulació de diferents fàrmacs com diclofenac (antiinflamatori i analgèsic), gentamicina (bactericida) i quercetina (antioxidant). Els resultats obtinguts indiquen que els nanogels tenen propietats antioxidants i són biocompatibles, a més de servir com a plataforma per encapsular diferents compostos terapèutics. Tot i la necessitat d'una anàlisi més ampli sobre les propietats d'aquestes nanopartícules, el present estudi posa les bases per a la preparació d'nanogels amb un gran potencial per a aplicacions oftalmològiques com gotes, recobriment de lents de contacte o fins i tot formulades en pomades.



GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

NANOGELES PARA APLICACIONES OFTLMOLÓGICAS

SUMMARY

The administration of drugs in the eye is a complex process, since it can present some drawbacks such as tissue barriers, blinking or the naso-lacrimal drainage system. In short, they are physiological processes that cannot be avoided, so a drug and an ideal route of administration will have to be found to solve these problems. In the field of ophthalmology there are various routes of drug administration, including topical, sub-conjunctival, suprachoroidal, intravitreal, intravenous and oral. In the topical route, it is very common for drugs to be administered in gel state. On the other hand, hydrogels are described as hydrophilic polymeric networks that are characterized by having a soft texture, being porous and having a high water content, that's why they are considered an ideal material to transport substances since its formation process can be used to encapsulate substances. If we speak at the nanometric level, there is currently a lot of ambition in the scientific community to design nanogels with a wide structural variety in order to innovate and improve the way in which drugs are administered in the human body, and in this case, in the eye.

In this project, it is intended to synthesize a nanogel of hyaluronic acid and dopamine as a platform to encapsulate, transport and release therapeutic agents and drugs for ophthalmological applications. Hyaluronic acid is a biopolymer which is biocompatible with the eye, since it can be found in different ocular structures such as aqueous humor and tears. In addition, it is a compound widely used in ophthalmology for the moistening of the cornea and the stability of the tear film. For the preparation of the nanogels, hyaluronic acid modified with dopamine, a natural phenolic compound with antioxidant properties, was used with the desolvation method. Once the nanoparticles were formed, through the action of the laccase enzyme, a reaction was initiated between the conjugated dopamine molecules in the polymer to create a network that stabilizes the structure of the nanoparticles. The methodology was applied to encapsulate different drugs such as diclofenac (anti-inflammatory and analgesic), gentamicin (bactericidal) and quercetin (antioxidant). The results obtained indicate that nanogels have antioxidant properties and are biocompatible, in addition to serving as a platform to encapsulate different therapeutic compounds. Despite the need for a broader analysis of the properties of these nanoparticles, the present study lays the foundations for the preparation of nanogels with great potential for ophthalmological applications such as drops, lens coating or even formulated in ointments.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Tzanko Tzanov, el director de este proyecto por darme la oportunidad de llevar a cabo mi proyecto de fin de carrera en el departamento de ingeniería química, donde he conocido un mundo totalmente diferente hasta ahora, gente muy buena y profesional y una forma de trabajar y ver las cosas muy diferentes a lo que estaba acostumbrado. A mi tutora Sílvia Pérez por toda su dedicación, paciencia y orientación durante los meses que he trabajado en el laboratorio. A todos los profesores que me han instruido en mi carrera universitaria, por vuestra dedicación y enseñanza. También a todas esas personas que han estado a mi lado para apoyarme y darme ánimos cuando lo necesitaba.

Mencionar especialmente a mi madre de quien, de no ser por ella y todos sus sacrificios por mí no estaría donde estoy ahora. Simplemente, gracias.

INDICE

1. INTRODUCCIÓ	Pág. 9
1.1. Concepto de gel, nanogel y nanopartícula	Pág. 9
1.2. Aplicaciones oftalmológicas	Pág. 11
1.3. Vías de administración de fármacos en el ojo	Pág. 11
1.4. Explicación conceptual y justificación de los materiales empleados	Pág.13
1.5. Método de desolvatación	Pág. 16
2. OBJETIVOS	Pág. 17
2.1. Objetivo general	Pág. 17
2.2. Objetivos específicos	Pág. 17
3. MATERIAL EMPLEADO Y METODOLOGÍA	Pág. 18
3.1. Reactivos químicos	Pág. 18
3.2. Instrumental	Pág. 18
3.3. Metodología	Pág. 22
3.3.1. Modificación del HA	Pág. 23
3.3.2. Caracterización	Pág. 24
3.3.3. Preparación de la disolución con lacasa	Pág. 26
3.3.4. Síntesis de nanogeles	Pág. 27
3.3.5. Proceso de encapsulación de fármacos	Pág. 29
3.3.6. Caracterización	Pág. 29
3.3.7. Estudios de biocompatibilidad	Pág. 30



3.3.8. Capacidad oxidante.....	Pág. 31
3.3.9. Actividad antimicrobiana.....	Pág. 31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Pág. 33
4.1. Modificación del ácido hialurónico.....	Pág. 33
4.2. Formación de nanogeles.....	Pág. 34
4.3. Caracterización de los nanogeles.....	Pág. 37
5. CONCLUSIONES.....	Pág. 42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 43

1. INTRODUCCION

1.1 Concepto de gel, nanoqel y nanopartícula

Se entiende por gel aquel estado de la materia en el cual el estado sólido coexiste con el estado líquido, predominando las propiedades del primer estado, lo que se denomina como estado coloidal, esto sucede cuando hay polímeros del material primario entrelazados entre sí (crosslinking) que son los que le dan las propiedades de sólido, pero los polímeros no están lo suficientemente conglomerados ni sus enlaces son lo suficientemente fuertes como para que sea una materia puramente sólida, generalmente entre estos espacios hay contenido líquido que es lo que permite la flexibilidad y moldeabilidad. La textura del estado de gel puede ir desde una similar a una gelatina hasta una parecida a una mucosa que carece de forma o que adopta la forma del recipiente que la contiene.

Los hidrogeles son una variante de los geles que se caracterizan por ser redes poliméricas hidrofílicas, contener un elevado contenido de agua y ser muy porosos. Estos tienen varias clasificaciones:

1. Por el tipo de enlace que contienen, y de estos derivan los que son químicamente reticulados y los que son físicamente reticulados.
2. Por el tipo de carga que presentan. Estos pueden ser catiónicos, aniónicos y anfotéricos.
3. Si son estímulo-sensibles o estímulo-no sensibles. Los estímulo-no sensibles son aquellos que solamente aumentan su tamaño cuando se encuentran en presencia de un medio acuoso. En cambio, los estímulo-sensibles son aquellos que reaccionan o responden a cambios en el ambiente que los rodea (temperatura (fig. 1), pH, luz, campo eléctrico, etc.).

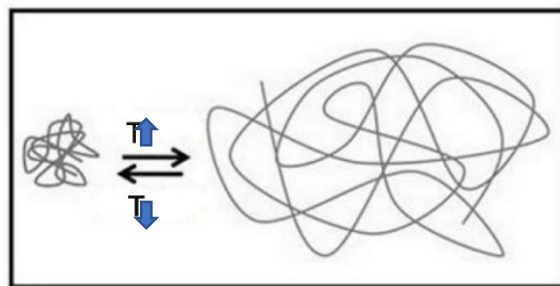


Figura 1. Comportamiento de los hidrogeles en función de la temperatura. De izquierda a derecha se representa el comportamiento de un hidrogel con aumento de temperatura, y de derecha a izquierda el comportamiento de un hidrogel (Rayo et al., 2014).

4. Por su tamaño

Los hidrogeles pueden también apreciarse a pequeña escala, escalas nanométricas. Los nanogeles se describen también como una red polimérica tridimensional reticulada que se crea por enlaces de hidrógeno e incluso enlaces covalentes, como se ha descrito antes. Los polímeros pueden también estar hechos de materiales orgánicos (biopolímeros). Estos espacios entre polímero y polímero pueden aprovecharse para introducir diferentes medicamentos o fármacos. Este proyecto no es el primero en pensar en esta estrategia. Hay actualmente otros estudios y artículos que ya hablan de este método como posibilidad de plataforma de transporte (Torres-Martínez, 2021). Esto es debido a que en la misma estructura del nanogel no sólo se pueden encapsular fármacos (Abedi et al., 2021), sino también hacer que más compuestos con diversas funcionalidades formen parte también de la estructura misma de la nanopartícula, siendo así funcional y útil en todos los aspectos estructuralmente hablando (Tahara et al., 2015).

Ahora bien, si se hace referencia a una nanopartícula se debe mencionar en primer lugar sus tres dimensiones no superarán los 100 nm. La ciencia que estudia y trabaja con las nanopartículas es la nanotecnología. Gracias a esta tecnología, las empresas farmacéuticas pueden trabajar con estos y manipular sus estructuras moleculares y sus componentes, consiguiendo evolucionar en muchos aspectos que permiten que sean más polivalentes. Dentro del ámbito de las nanopartículas se clasifican por los materiales que la componen, algunas de ellas son:

1. Nanopartícula de base de carbono, tienen peso reducido, gran dureza, elasticidad y buenas conductoras de la electricidad
2. Nanopartícula de base metálica, nanopartículas que pueden ser de oro o plata. También pueden ser puntos cuánticos o transistores de un electrón.
3. Dendrimeros, este tipo de nanopartícula son en realidad polímeros que se van ramificando a raíz de un polímero principal. La terminación de las cadenas o "ramas" pueden hacer una función concreta.
4. *Composites*, son nanopartículas combinadas entre sí o con materiales de mayor tamaño.

1.2 Aplicaciones oftalmológicas

Ahora bien, si se habla de un nanogel que tiene dimensiones, como su nombre bien indica, nanométricas, se podrán aprovechar para que estos, con las propiedades de los hidrogeles, suministren fármacos como se ha planteado en el apartado anterior. Por ello pueden sintetizarse nanogeles o nanopartículas que permitan una mejor administración del fármaco. Basándose en estudios previos a este proyecto, se puede decir que las ventajas de, por ejemplo, nanopartículas poliméricas o nanogeles poliméricos (Rayo et al., 2014) permiten una liberación controlada del fármaco, un aumento en la estabilidad en el fármaco a suministrar y en la biodisponibilidad. Se pueden también diseñar para un tejido en específico, esto se verá más a fondo en el siguiente apartado. Y por último que pueden presentar mejores resultados a la hora de interactuar con mucosas si se escogen los compuestos biocompatibles adecuados (Swetledge et al., 2021). Por otro lado, también pueden utilizarse tanto materia inorgánica como metales (Chan et al., 2021) en el diseño de las nanopartículas, así como materiales biocompatibles como lípidos (Huang et al., 2019), proteínas, ácidos, etc. Cuando ya se tiene sintetizado el nanogel o nanopartícula deseada se procede a su correcta administración (Li et al., 2021). Hay una mayor probabilidad de biocompatibilidad si el nanogel está formado por biopolímeros, analizando y escogiendo compuestos y monómeros que sean compatibles con el ojo, sus tejidos y mucosas.

1.3 Vías de administración de fármacos en el ojo

Los fármacos se distribuyen de diversas formas en el cuerpo humano, las principales son: oral, sublingual, tópica, transdérmica, oftalmológica, respiratoria, rectal, vaginal y parental. Cuando los fármacos se introducen en el cuerpo se da comienzo al proceso farmacocinético, que consta de cinco fases: liberación, absorción, distribución y excreción. Sin embargo, este trabajo tiene como objeto directo el desarrollo de un material que sirva como transporte de fármacos, como pueden ser agentes antimicrobianos, antiinflamatorios y hasta nutrientes que contribuyan al buen funcionamiento del órgano de la vista, por lo que se hará más énfasis en la fase de liberación. Las vías de administración de éstos en el ojo pueden ser tópica, oftalmológica, oral y sistémica (Swetledge et al., 2021) y dependiendo de donde se administre se escogerá una vía u otra (fig. 2). Cabe destacar que dentro de la vía oftalmológica hay varios subtipos de vías dependiendo del tejido diana donde se suministrará el fármaco.

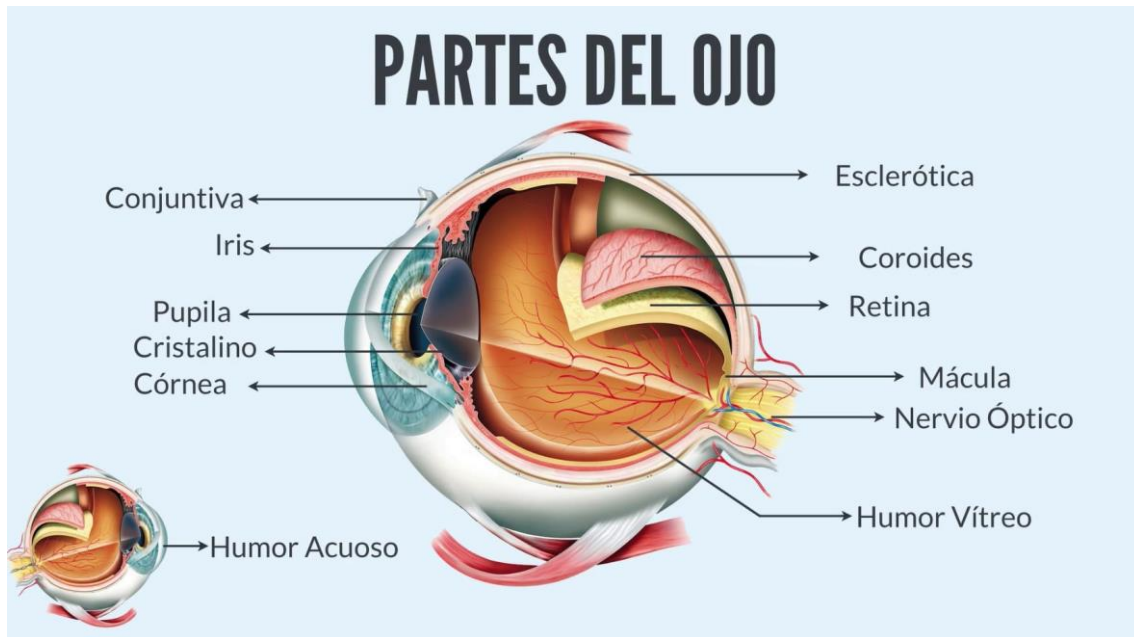


Figura 2. Anatomía del ojo

- Tópica: vía que se administra el medicamento en forma de pomada o colirios, en este caso el fármaco administrado solo alcanzará los tejidos del segmento anterior del ojo como lo es la conjuntiva, la córnea y la esclerótica. La vía tópica es favorable cuando el tejido diana es la córnea o la conjuntiva. Es muy común que en infecciones del segmento anterior se apliquen por esta vía los antibióticos, antiinflamatorios y colirios humectantes. Es de vital importancia ya que la córnea es un tejido que carece de vascularización, por lo que es la única vía con la que pueden suministrarse fármacos en este tejido.
- Sub-conjuntival: vía que se aplica mediante inyección cuando se quiere que el medicamento llegue directamente al tejido conjuntival, escleral y coroides. Todo dependerá de cual sea el tejido diana al que se quiera administrar el medicamento.
- Supracoroidal: vía inyectable que se aplica cuando se quiere que el fármaco administrado llegue principalmente a la coroides o en bajas concentraciones a los vasos retinianos y, en consecuencia, a la retina.
- Intravítrea: en esta vía se inyecta cuando se quiere llegar directamente al humor vítreo. Aunque también es usado cuando se quiere administrar ciertos medicamentos en la retina.

- Endovenosa: esta vía, que también es inyectable, se diferencia de las demás porque de todas las mencionadas anteriormente no se inyecta cerca o directamente en el tejido diana. Si no que se administra inyectándose en una parte del cuerpo donde el torrente sanguíneo es abundante. Como su nombre bien indica se inyecta en una vena, de manera que la sangre vaya inmediatamente al corazón para ser bombeada por todo el cuerpo. Esta vía suele aplicarse cuando es necesario que el fármaco administrado llegue a todos los tejidos oculares que posean riesgo sanguíneo (Klont et al., 2005). Suelen usarse en casos severos de endoftalmitis y queratitis donde más de un tejido con riego sanguíneo está inflamado. Así se evita perforar con una aguja más de una vez el segmento ocular anterior.
- Oral: vía cuyo mecanismo de acción y distribución del fármaco es similar a la endovenosa con la diferencia que su farmacocinética es diferente. Ya que este posee las fases de liberación y absorción

1.4 Explicación conceptual y justificación de los materiales empleados

Para hacer los nanogeles, como se ha explicado antes, es importante analizar los compuestos de los que se hará la plataforma que encapsulará los fármacos, por lo que los materiales compuestos han sido ácido hialurónico, dopamina y lacasa. Cabe destacar que estos se explicaran con más profundidad en el apartado de materiales y metodología. A continuación, una breve presentación de los compuestos

Ácido hialurónico (fig. 3): es un componente que formará parte del nanogel que se sabe que es biocompatible con el ojo dada su presencia en algunas estructuras oculares como la lágrima o el humor acuoso. Además, es el principal compuesto que se usa en los colirios llamados "lágrimas artificiales", dado que este aporta humectabilidad e hidratación a la superficie anterior del ojo. Al ser un ácido se puede decir que es un compuesto hidrofílico, además de eso, su estructura química permite que sea modificable con otros compuestos, como mesoporos, compuestos fenólicos o tioles. Dadas sus amplias propiedades y combinabilidad con otros compuestos químicas es un material comúnmente para síntesis de geles o nanogeles (Fei et al., 2020).

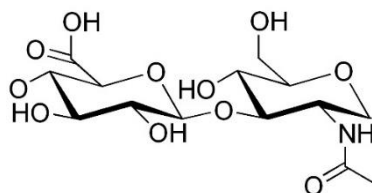


Figura 3. Estructura del ácido hialurónico

Dopamina (fig. 4): es el compuesto escogido para conjugar con el ácido hialurónico; un compuesto fenólico que aporta propiedades antioxidantes a la futura plataforma a sintetizar. La composición de la molécula hace que sea conjugable con el ácido hialurónico.

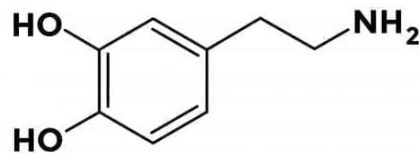


Figura 4. Estructura de la dopamina

Lacasa: es una enzima que se utilizará para dar estabilidad a los nanogeles una vez se hayan formado haciendo que los fenoles interactúen entre si creando enlaces que serán más resistentes que los enlaces que se han establecido durante el "crosslinking" de los polímeros de HA-DOPA.

Por otro lado, los fármacos escogidos para ser encapsulados son:

- Gentamicina (fig. 5), es un bactericida que se utiliza comúnmente para tratar infecciones bacterianas agudas. Habitualmente se suministra inyectándose en el tejido en el cual se encuentra la infección.

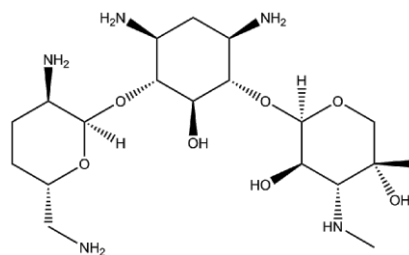


Figura 5. Estructura química de la gentamicina

- Quercetina (fig. 6), es un flavonol natural y un antioxidante que se encuentra en varias fuentes vegetales. Reconocida por sus efectos curativos en el tratamiento de enfermedades oftálmicas debido a diversas actividades biológicas, tales como actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antifibrosis (Zhao et al., 2021).

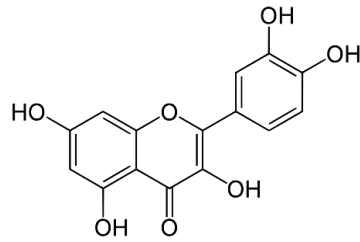


Figura 6. Estructura de la quercetina

- Diclofenaco (fig. 7), es un antiinflamatorio no esteroideo, aunque también se usa como analgésico.

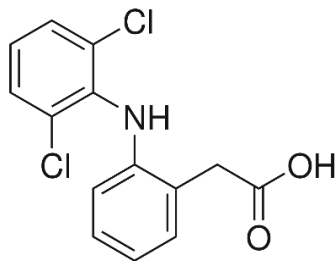


Figura 7. Estructura del diclofenaco

1.5 Método de desolvatación

Mejor conocido como *desolvation method* en inglés, es el método escogido para sintetizar los nanogeles. A pesar de que es un método que inicialmente está pensado para proteínas (Jun et al., 2011), se intentará hacer con el conjugado HA-DOPA. Este método consiste en añadir un disolvente orgánico como lo son los alcoholes o la acetona para conseguir que los polímeros que se encuentran disueltos en un medio acuoso se contraigan mediante enlaces de hidrogeno o enlaces no covalentes y se formen así los nanogeles (fig. 8). Dicho disolvente debe ser añadido gota a gota con un volumen y velocidad de adición controlado. En este caso se añadirá lacasa a la solución una vez se haya completado el método y se hayan formado los nanogeles (aparición de turbidez). Durante todo el proceso habrá un agitador magnético agitando la mezcla. A pesar de que este protocolo está principalmente indicado para polímeros proteicos o proteínas hay estudios previos que evidencian que es aplicable también para el ácido hialurónico (Fang et al., 2011), por esto, se ha decidido emplear este método, con la diferencia de que no se estabilizarán los nanogeles con reactivos químicos como dicta el protocolo original, sino que se empleará la lacasa para dar firmeza a la estructura de estos. Este método de síntesis tiene potencial para encapsular diferentes fármacos durante el proceso de desolvatación.

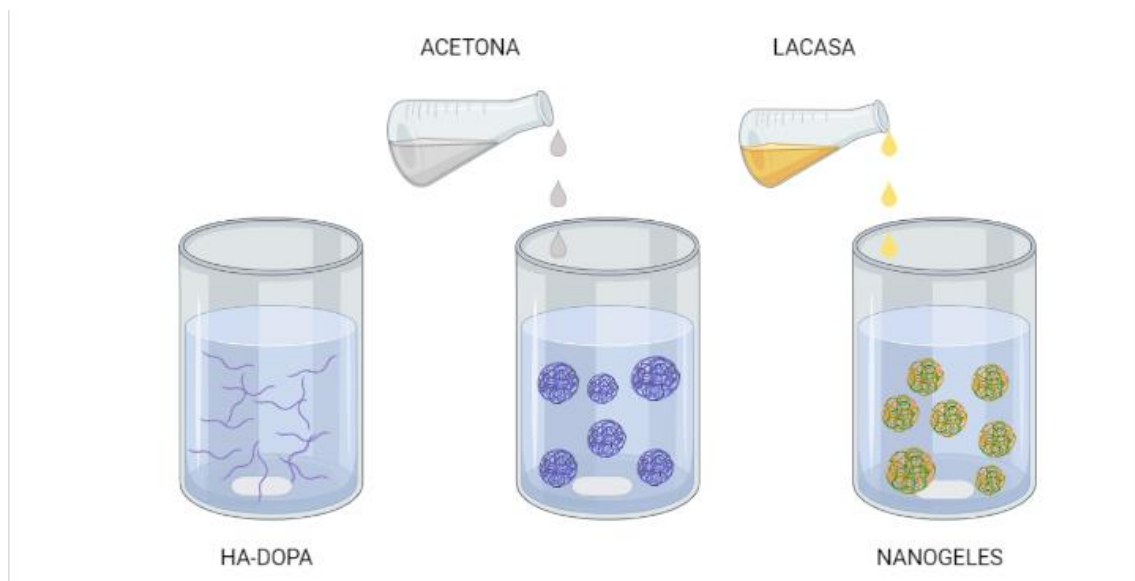


Figura 8. Esquema resumido del método de desolvatación

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

El objetivo de este proyecto es sintetizar un nanogel biocompatible, biodegradable y con propiedades antioxidantes como sistema de encapsulación, transporte y liberación de diferentes agentes terapéuticos para su uso en aplicaciones oftalmológicas.

2.2 Objetivos específicos:

Para poder conseguir el objetivo principal identifican y plantean los siguientes objetivos específicos:

- Modificación de HA de dos pesos moleculares (60 y 200 KDa) con el compuesto fenólico dopamina para obtener HA-DOPA.
- Caracterización del polímero HA-DOPA con técnicas espectroscópicas y métodos colorimétricos
- Optimización del proceso de síntesis de nanogeles compuestos de HA-DOPA y estabilizados con la acción de la enzima lacasa.
- Encapsulación de diferentes agentes terapéuticos relevantes para su aplicación en oftalmología.
- Evaluación de las propiedades de los nanogeles desarrollados como biocompatibilidad, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

3. MATERIAL EMPLEADO Y METODOLOGÍA

3.1 Reactivos químicos:

- Ácido hialurónico (de la casa comercial LEHVOSS, peso molecular 60 KDa y 200 KDa)
- Dopamina
- Etanol
- Acetona
- Lacasa (enzima)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
- N-hidroxisuccinimida (NHS)
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu

3.2 Instrumental:

- Zetasizer (Imagen 1): se utiliza para la caracterización de las nanopartículas midiendo su tamaño en nanómetros y potencial zeta. Se utiliza el software XX para controlar y procesar los datos adquiridos en las diferentes mediciones. Este instrumento es de gran utilidad para la evaluación del efecto que tienen diferentes parámetros de una solución (temperatura, pH, concentración del soluto, etc.) o de una ruta sintética (tiempo de reacción, propiedades de los precursores, etc.) en las propiedades de las nanopartículas.



Imagen 1. Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments).

- Liofilizador (imagen 2): aparato cuya función es eliminar el agua de las muestras (deshidratar) aplicando vacío y bajas temperaturas a las muestras previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Imagen 2. Liofilizador CRYODOS (Telstar®)

- Agitador magnético (imagen 3): se usa para agitar las soluciones. Se introduce una pequeña barra magnética dentro del recipiente para que la mezcla pueda agitarse correctamente.



Imagen 3. Fotografía del agitador magnético con 15 posiciones *CIMAREC i Poly*. En el fondo del recipiente se observa la barra magnética que al moverse agita la mezcla

- Incubadora (imagen 4): este equipo permite mantener un ambiente con una temperatura y humedad controlada y constante.



Imagen 4. Incubadora modelo SANYO XX.

- Centrifugadora (imagen 5): mediante la rotación de las muestras, esta máquina permite separar las diferentes fases de una muestra (generalmente líquida y sólida) o sus componentes en función de su densidad.



Imagen 5. Centrifugadora BECKMAN COULTER en la que se ha preparado la disolución de lacasa.

- Lector de plaques (imagen 6): es un espectrofotómetro que permite medir absorbancia (en el rango del ultravioleta-visible), fluorescencia y luminiscencia.

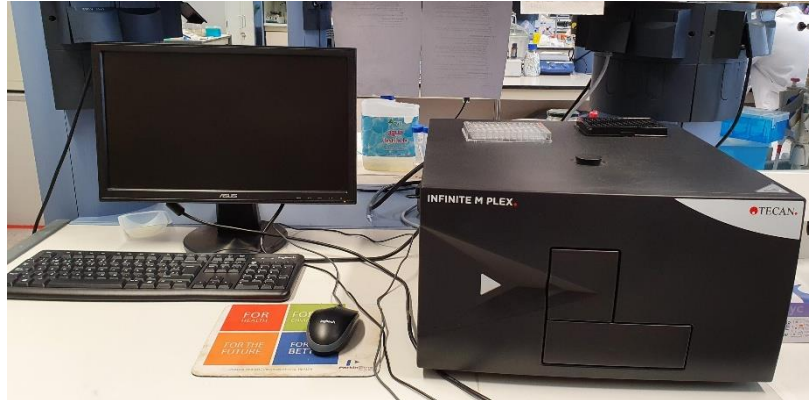


Imagen 6. Lector de plaques *INFINITE M PLEX* (TECAN).

- Bomba de jeringa (imagen 7), sirve para dispensar o bombear un líquido, dentro de una jeringa, con una velocidad de adición y volumen determinados.



Imagen 7. Bomba de jeringa *kdScientific*.

3.3. Metodología

Se ha decidido trabajar con diversos compuestos para que formen las capsulas de forma que sirvan como almacenamiento y transporte de dicho fármaco para su posterior liberación cuando se entre en contacto con la superficie ocular. Estas nanopartículas están compuestas de ácido hialurónico (HA) con dopamina (DOPA), dado que estos dos compuestos estarán unidos en todo momento se hará referencia a él en todo momento con la nomenclatura de HA-DOPA.

Se ha escogido ácido hialurónico (fig. 3) por una parte para la creación de la estructura que almacenará el fármaco antimicrobiano porque el ácido hialurónico es altamente biocompatible. Este compuesto es el principal componente de la capa mucosa de la película lagrimal que recubre la superficie ocular. Por otro lado, este compuesto es una sustancia humectante que ayuda en la sequedad ocular, por lo que no solo ayudará a la función principal que es la de formar la estructura de la nanopartícula, sino también ayudará a que el ojo tenga una buena humectación cuando se usen en la superficie ocular.

El HA es un compuesto que ha demostrado ser un buen candidato para formar estructuras de hidrogel cuando este se unifica mediante *crosslinking* (Xu et al., 2021). Y tampoco sería la primera vez que se utiliza para la finalidad con la que se usa en este caso, que es en la liberación de fármacos (Zhang et al., 2021), de manera que se ha escogido este material como base de la nanopartícula.

Por otra parte, la dopamina (fig. 4) es un compuesto fenólico que aporta funciones sobre todo antioxidantes, estructurales, y antisépticas (mediante funciones secundarias por interacción con la membrana de las células del tejido diana) por lo que ayudará a la efectividad de los objetivos que se pretende en este proyecto, y no solamente eso, sino también ayudará a la fijación de la estructura de la cápsula que llevará dentro de sí el fármaco que se desee suministrar.

Entonces, si ambos compuestos se combinan se obtiene una nanopartícula capaz de transportar diversos fármacos para su posterior liberación cuando éstos entren en contacto con el ojo, párpados, córnea, vítreo, retina, esclera, etc.

Para llevar éste procedimiento a cabo será necesario también la enzima lacasa, la cual es una enzima que pertenece al grupo de las oxidasas de cobre azul cuya función catalítica permite la oxidación de un sustrato orgánico y la reducción de un oxígeno molecular a agua mediante un mecanismo de transferencia de un solo electrón.

En el caso de la modificación del ácido hialurónico con dopamina (HA-DOPA) su función es mantener la estabilidad estructural de las nanopartículas de HA-DOPA una vez se hayan formado mediante la adición de una cantidad de acetona determinada, de forma que cuando las nanopartícula ya no se encuentren en un medio con presencia de acetona sigan manteniendo la integridad de la estructura de

esta. La lacasa lo que permite es que los fenoles interactúen con ella y entre ellos creando enlaces covalentes que serán mucho más resistentes que los enlaces de hidrógeno establecidos al inicio.

Cuando se han formado correctamente los nanogeles, se puede proceder a la encapsulación de los fármacos usando el mismo proceso que se explicará con detalle en el apartado de *material y metodología*.

Se recuerda que los fármacos escogidos para ser encapsulados son los siguientes, cuyas propiedades se han descrito en la introducción:

- Gentamicina (fig. 5)
- Quercetina (fig. 6)
- Diclofenaco (fig. 7)

3.3.1 Modificación del HA

Para este proceso se han seguido las instrucciones del protocolo extraído de un artículo en el que se modifica también ácido hialurónico con dopamina (Lih et al., 2016) pero con fines diferentes. El protocolo a seguir es el siguiente:

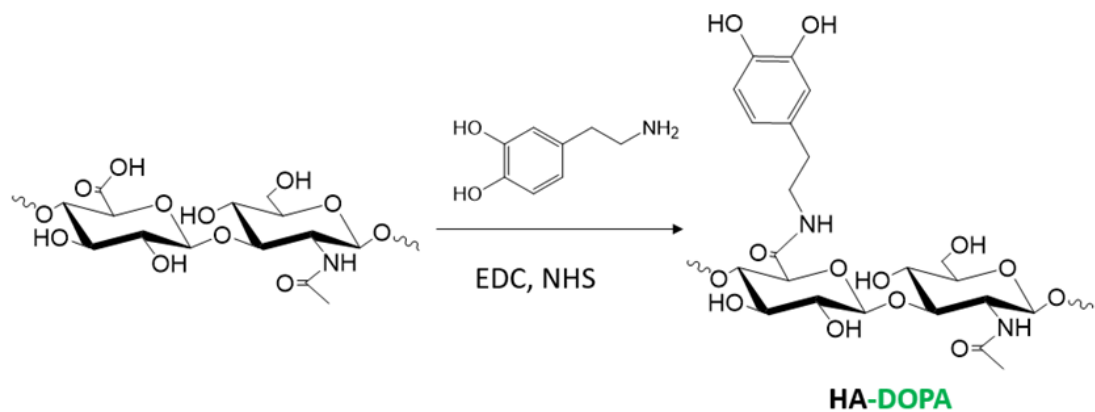


Figura 9. Modificación del HA con dopamina.

Tal y como se observa en el esquema de reacción (fig. 9), la modificación del HA para obtener HA-DOPA se produce cuando los grupos carboxilos de la cadena del HA, activados con el reactivo EDC, reaccionan con los grupos amino libres de la dopamina. Primero, 500 mg de HA de 60 kDa o 200 kDa se disuelven en 50 ml de buffer de acetato de sodio de concentración 0,5 M y pH de 5,5. En intervalos de 15 minutos se añaden 288mg de EDC y 173mg de NHS sucesivamente. Para añadir el EDC y el NHS se ha optado por ponerlos en una disolución con buffer para así añadir siempre la misma cantidad de compuesto a la solución cada 15

Facultat d'òptica i optometria de Terrassa

minutos. Se dejan mezclando durante 4 horas a temperatura ambiente manteniendo en todo momento un pH de 5,5. Posteriormente, la solución cruda se purifica mediante diálisis durante 3 días usando primero agua acidificada (pH 5,5) y burbujeando nitrógeno gas para evitar la oxidación de los grupos fenólicos de la dopamina y después con agua neutra para ajustar el pH. Pasado este tiempo, se recoge la solución de la membrana de diálisis, se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofiliza durante 3 días. Finalmente, el HA modificado con dopamina de 60 y 200 kDa puro y seco de aspecto algodonoso (imagen 8) se conserva en un recipiente cerrado con atmosfera de nitrógeno a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en la síntesis de los nanogeles.

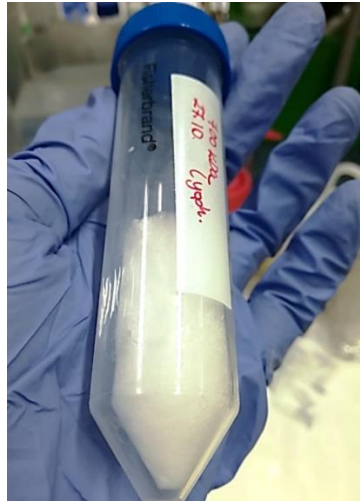


Imagen 8. Conjugado HA-DOPA al final del proceso de modificación.

3.3.2 Caracterización

Cuando ya se obtiene el conjugado HA-DOPA se caracteriza por las siguientes técnicas:

1. Espectrómetro UV, en los que se cuantifican los grupos catecol presentes en el HA-DOPA mediante a una longitud de onda de 280nm con una curva estándar de dopamina.
2. Infrarrojos, son los que indican que tipo de interacción química (enlaces) hay en los nanogeles.
3. Método FOLIN-CIOCALTEAU, que es una prueba que teñirá las muestras que se pongan en las microplacas (imagen 9). Cuanto más oscura se tiña el contenido de la placa, mayor concentración de grupos fenoles hay en la muestra (Moisa et al., 2018). Este es un proceso complejo en el que primero se prepara una solución de bicarbonato de sodio con agua al 20%, luego otra solución con Folin-Cicalteau diluido al 10% de su concentración original y por

Facultat d'òptica i optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, 2021. Todos los derechos reservados

último una solución de dopamina 1mg/ml, la cual será útil al obtener los resultados que se explican más adelante ya que se conoce su concentración. En cada celda se añaden primero 100 μ L de la muestra a analizar, seguido de 20 μ L de la solución de carbonato de sodio y en último lugar la solución de Folin-Ciocalteu. Cuando se mezcla todo el contenido de los pozos va adquiriendo una tonalidad azulada en función a la concentración de grupos fenoles de la muestra (imagen 9). Se observa que si el compuesto contiene dopamina, es decir, grupos fenol, los reactivos del Folin-Ciocalteu se reducen y dan lugar al característico color azul. Se ve más específicamente en el esquema (fig. 10).

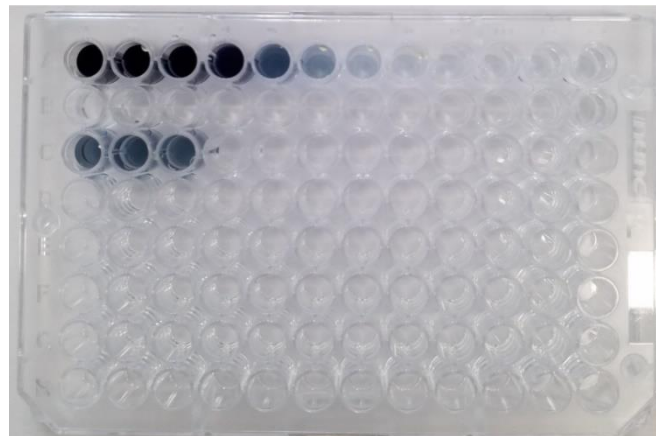


Imagen 9. fotografía de los pozos con muestras de diferente concentración de dopamina.

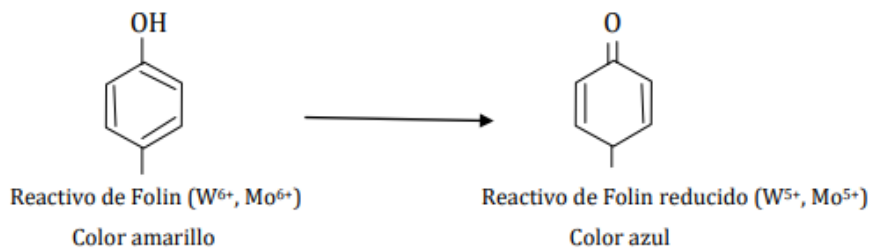


Figura 10. Reacción Folin-Ciocalteu, donde wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico.

Después, se mide en el lector de microplacas (imagen 6) la absorbancia para cada pozo para una longitud de onda de 765nm para así relacionar la absorbancia de la luz para ese color con la concentración de los grupos fenólicos. Como resultado se obtiene una tabla que se crea en Excel con los datos obtenidos. Con los datos se hace una gráfica lineal, conocida como "recta de calibrado" de la que se descartan los puntos que no son relevantes, de manera que los puntos que

formen parte de los datos tengan forma de recta lineal (fig. 11). Sólo entonces, se obtiene la recta de regresión, cuya ecuación nos sirve para saber la concentración de compuestos fenoles (en este caso de dopamina) de la muestra.

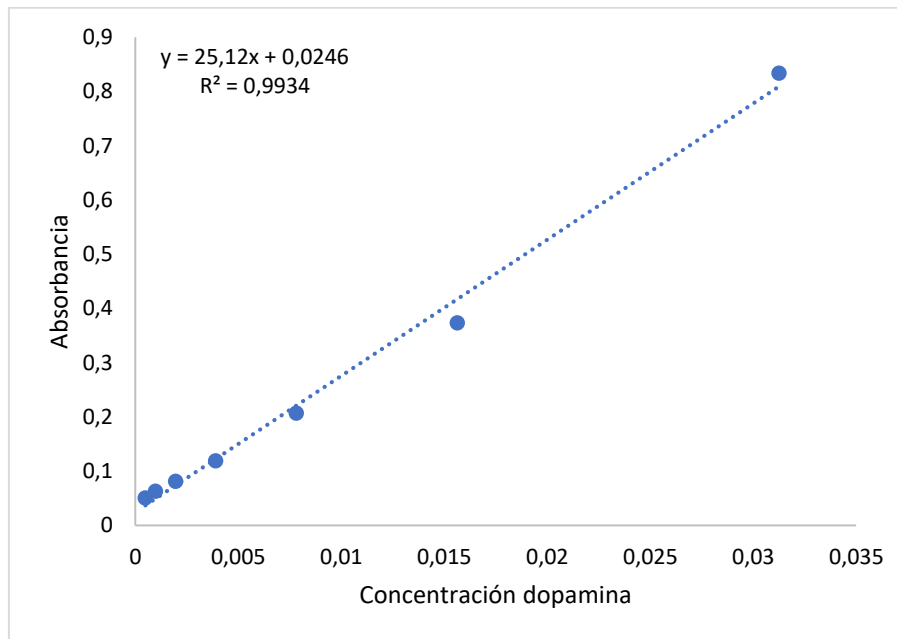


Figura 11. Recta de calibrado obtenida con el valor de absorbancia a 765 nm para soluciones de dopamina de diferentes concentraciones.

3.3.3 Preparación de la disolución con lacasa

Como se ha explicado antes la lacasa juega un papel importante en el proceso de síntesis de los nanogeles. Antes de la formación de los nanogeles se debe tener lista una solución de lacasa. Para ello se añaden 5 ml de agua destilada y filtrada en un recipiente que contenga 100 mg de lacasa comercial, la cual se presenta en un formato de pequeñas capsulas (1 mm aproximadamente), para así conseguir una concentración de 20 mg/ml. Después de esto se coloca en un agitador tipo vórtex por 10 minutos para que con la agitación se rompan las capsulas que contienen las enzimas dentro, con esto la solución adquirirá un color blanquecino turbio. Posteriormente, se coloca la solución en un tubo falcon mediano y seguido se deposita en la centrifugadora durante 5 minutos a una velocidad de 5000 r.p.m. Luego de sacar la solución de la centrifugadora se observa que todos los restos sólidos de las cápsulas han sedimentado al fondo del tubo. Se extrae con una pipeta mecánica de volumen variable la solución de color semitransparente obtenida con cuidado de no arrastrar los restos de las cápsulas que han sedimentado. Mientras esta solución no sea utilizada deberá

almacenarse en un lugar con bajas temperaturas para preservar sus propiedades.

3.3.4 Síntesis de nanogeles HA-DOPA

Una vez se tiene el conjugado HA-DOPA es entonces posible sintetizar los nanogeles. Se realiza el proceso de síntesis de los nanogeles de HA-DOPA.

Se empieza preparando una solución de HA-DOPA de concentración 0,5% y 1% con dos pesos moleculares, 60kDa y 200 kDa. Como disolvente se puede utilizar agua destilada y filtrada. Para preparar la solución se determina el peso de HA-DOPA necesario según el volumen de disolvente para conseguir la concentración deseada. Hecho esto, se pesa y luego se añade al disolvente el HA-DOPA. Se mezcla todo hasta que el HA-DOPA se ha disuelto completamente en el disolvente, esto se sabe cuándo la mezcla es totalmente transparente y ya no se observan restos sólidos. Una vez se ha disuelto todo el HA-DOPA se comienza a añadir progresivamente el disolvente orgánico (acetona o etanol) con la bomba de jeringa, lo que hará se formen las nanopartículas. Se prueban diferentes velocidades de adición para ver con cual es en la que se forman nanogeles mejor optimizados (se profundizará en el apartado “resultados y discusión”). Según los experimentos realizados se determina que en la mayoría de los casos la mezcla alcanza la máxima turbidez cuando se aplica el doble del volumen de acetona que el volumen de la solución de HA-DOPA diluido.

En la fase inicial, es decir, antes de añadir el disolvente orgánico la solución tiene un aspecto transparente (imagen 10. A) que va cambiando a medida que se vierte progresivamente la acetona. Cuando la turbidez no cambia o aumenta (imagen 10. B) durante un periodo entre 30 segundos a un minuto querrá decir que la concentración del disolvente orgánico ha llegado a su máxima efectividad y, en consecuencia, deja de suministrarse. Cabe destacar que no en todos los casos se obtiene la misma turbidez en todas las soluciones, ya que esto dependerá, en gran parte, de la exactitud de la repetibilidad de los ensayos. De nuevo, esto se desarrollará con más detenimiento en el apartado “resultados y discusiones”. Luego de detener el suministro de acetona se deja reposar unos 10 minutos para que las nanopartículas se acaben de formar.

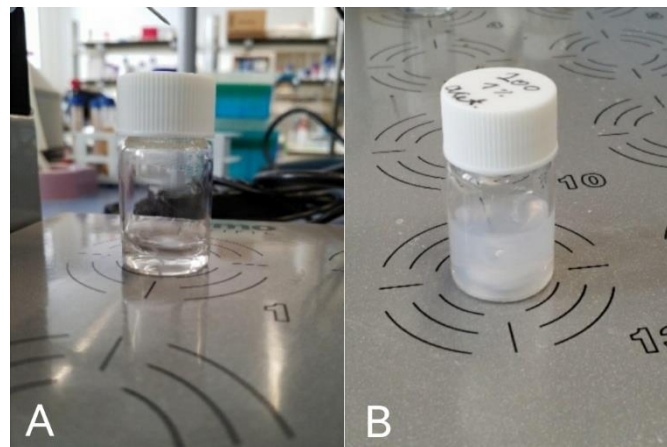


Imagen 10. Antes (A) y después (B) de la formación de las nanopartículas

Cuando se consigue el grado de turbidez máximo y se deja de verter acetona en la solución se procede a añadir lacasa a esta (100uL por mililitro de disolución). La lacasa es la que permitirá que se mantenga la estructura del nanogel cuando este ya no esté en un medio en el que haya presencia de acetona. En presencia de la lacasa la dopamina se oxida, haciendo que la solución adquiera un aspecto igual de turbio, pero de tonalidad rosácea (imagen 11). Cuando ya se ha dejado reposar toda la mezcla durante 5 minutos se ponen los nanogeles en la incubadora a 37 °C por 4 horas, esta temperatura se establece en este valor porque es donde la actividad de la lacasa es mayor. Posterior a las 4 horas en la incubadora se sacan los nanogeles se dejan enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los nanogeles se obtienen de la solución de reacción por centrifugación (18.000 rpm, 45 minutos). Los nanogeles van al fondo del recipiente y en la parte superior queda la solución con los reactivos y precursores que no han reaccionado. Se descarta esta solución y se resuspenden los nanogeles en la misma cantidad de agua pura.

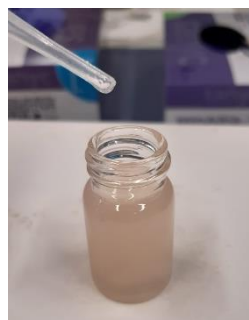


Imagen 11. Aspecto de los nanogeles posterior a la adición de la lacasa

3.3.5 Proceso de encapsulación de fármacos

Para empezar, se deberá seguir el mismo protocolo que se ha explicado antes para la síntesis de los nanogeles. Con la diferencia de que aquí se tendrá que tener en cuenta la solubilidad de cada uno de los fármacos escogidos para que éstos puedan ser encapsulados como es debido. Por solubilidad es hidrófoba la quercetina, mientras que la gentamicina y el diclofenaco son hirofílicos. Entonces, según su solubilidad se procederá de una forma u otra.

Los fármacos que son solubles en agua son introducidos en la solución cuando el HA-DOPA está totalmente disuelto, antes de empezar a añadir el disolvente orgánico. En cambio, con la quercetina, que es el único compuesto hidrófobo, se disolverá en el disolvente orgánico para que pueda disolverse homogéneamente en este y se diluya en la mezcla de forma adecuada, ya que si intentáramos diluirlo con el HA-DOPA en agua este precipitaría y no de diluirá. Por lo que una vez los fármacos están disueltos en sus respectivos medios se procede a seguir el protocolo de síntesis de nanogeles tal y como se ha descrito antes.

3.3.6 Caracterización

1. Zetasizer, donde se mide el tamaño de los nanogeles y su potencial eléctrico. Se colocan en sus respectivas celdas dependiendo de lo que se vaya a medir (medida o potencial eléctrico). Para colocar la muestra en la celda se diluye 100 µl de la muestra en 1,5 ml de agua destilada y filtrada. Luego se procede a obtener la medida que se desee. Si los nanogeles han estado más de 24h en reposo y refrigeración será idóneo pasar la muestra a analizar por el sonicador antes Es importante atender a las celdas para cada medida, ya que cada una tiene un diseño especial para hacer la medida correctamente, por ejemplo, la celda que se usa para medir el potencial electromagnético tiene dos electrodos a los laterales, mientras que la celda indicada para medir la medida de los nanogeles es solo un prisma rectangular de metacrilato.
2. Lector de microplacas con solución Folin-Ciocalteu, que indicaran la concentración de dopamina de las muestras observadas. Se sigue el mismo protocolo empleado en la caracterización del conjugado HA-DOPA.

3.3.7 Estudios de biocompatibilidad

Cuando ya se han hecho las pruebas de los nanogeles y se confirma que su estructura es la que se desea obtener, se procede a comprobar la biocompatibilidad *in vitro* mediante cultivos celulares. Para esto se han empleado células vivas *HaCat*, que son células de queratinocitos aneuploides que han sido transformadas espontáneamente de piel humana y células *BJ5α*, que son fibroblastos también modificados.

Protocolo de mantenimiento de células (necesario para posteriormente hacer el protocolo de toxicología):

Se ponen las células en placas y en la campana de mantenimiento de luz UV durante 20 minutos y luego se apaga la campana extractora. Se conecta la bomba de extracción y luego se añade medio, PBS y tripsinas, todo esto a 37 °C. Se retira el medio y el PBS aspirándolo cuidadosamente. Se cubre el fondo de la placa con tripsina y se deja incubando. Las células *HaCat* con tripsina transparente durante 12 minutos y las células *BJ5α* con tripsina roja durante 6 minutos. 5ml de medio son añadidos para inactivar la tripsina. El contenido de las placas se pasa a tubos falcon debidamente identificados. Los tubos con las células se centrifugan por 5 minutos a 150G. Por último, se retira el medio con cuidado de no arrastrar las células que se encuentran en el fondo.

Protocolo de toxicología:

Se suministran 3-4 ml de medio a cada tubo Falcon. Después, se resuspenden las células. El contenido de los tubos es traspasado a tubos Falcon grandes. Se ponen 10 µl de células en la cámara en la que se contarán las células. Se cubre la muestra con un cubre y se cuentan las células en un recuadro 4x4. Se ponen en las microplacas muestras de cada tipo de células, se pone medio en cada celda y se añaden los nanogeles. A su vez se dejan dos grupos control, células solamente con medio, las que se sabe que estarán vivas y células sin medio, que se sabe que cuando se analicen posteriormente estarán muertas. Dejar incubando a 27°C durante 24h. A partir de este paso se hace todo sin luz ambiental. Se prepara en la campana de luz UV 1 ml de *Alamar blue*, el cual es un reactivo comercial que cambia de color en función de si hay o no actividad metabólica celular, y se añade posteriormente 9ml de medio. Se aspira el antiguo medio de las muestras que se han incubado en la placa. Se añaden 10 µl de la solución *Alamar blue* a todas las células, incluso a las células muertas. Incubar durante 3-4 horas y analizar los resultados.

3.3.8 Capacidad antioxidante

Para comprobar la capacidad antioxidante de cada una de los nanogeles con sus respectivos fármacos se ha optado por seguir la técnica con compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el cual consiste en que el compuesto DPPH reaccione reduciéndose o no cuando este interactúe con los radicales de los compuestos de las muestras a analizar. Si el color de la muestra analizada pasa de ser color violeta a color amarillo claro querrá decir que dichos compuestos tienen propiedades antioxidantes. Para ello, se debe seguir el siguiente protocolo:

30mg de cada uno de las muestras de los nanogeles se incuban en las celdas de las microplacas, es importante tener identificada cada celda lo que contiene. Luego, 300 µl de solución de DPPH diluido en etanol con una concentración de 60 µM se añaden a cada una de las celdas donde hay muestra. Como grupo control se ponen en 3 celdas seguidas una muestra que se sabe que es oxidante y otra que no se oxidará (antioxidante). El ácido ascórbico se añade como antioxidante, es decir, como control positivo y el agua como control negativo. Mezclar las soluciones y dejar reposar por 30 minutos en total oscuridad a temperatura ambiente. Por último, analizar las muestras usando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de DPPH (\%)} = [1 - (A/A_0)] \times 100$$

Donde A_0 representa el valor de la absorbancia de control negativo y A corresponde a el valor de la absorbancia del DPPH.

3.3.9 Actividad antimicrobiana

Se analizó la actividad antimicrobiana de los nanogeles frente a la bacteria *P. aeruginosa* (ATCC®25923TM). Para esto se prepararon los medios de crecimiento de las bacterias: Nutrient Broth (Scharlab) (1.3 g en 100 mL de agua), y se esterilizaron en la autoclave. Se introdujo la bacteria en 5 mL del medio Nutrient Broth preparado anteriormente y se incubó agitándose (Incubadora BS-T, Certomat) a 37 °C durante 6-8 horas, junto con un tubo que sólo contenía el medio y que sirve como control para comprobar que no se ha producido contaminación durante el proceso de crecimiento de las bacterias. Una vez las bacterias estuvieron listas y se comprobó que no había contaminación (se observa turbidez en el tubo que contiene bacterias mientras que el tubo control

es transparente), se midió la absorbancia a 600 nm del medio Nutrient Broth y de las bacterias, y se calculó la diferencia de absorbancia entre cada bacteria y el medio, para diluirlas en el medio de forma que la densidad óptica sea $OD_{600}=0.01$, que se corresponde aproximadamente con 106 unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL). En otra placa de 96 pozos se preparó una dilución seriada de los nanogeles en medio con un volumen de 50 μL en cada pocillo. Finalmente, se añadió 50 μL de la solución de bacterias a cada pocillo. Además, se preparó un replicado de bacterias sin nanogeles, y otro solo con medio como control de contaminación. La placa se incubó a 37 °C durante 16 horas bajo una agitación de 240 rpm. La absorbancia de la placa se leyó antes y después de la incubación a 600 nm para obtener el valor final de absorbancia de cada muestra. El cálculo de la reducción del crecimiento bacteriano debido a la acción de los nanogeles se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de crecimiento bacteriana (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

Donde A y B indican la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de las muestras a las 24 horas sin nanopartículas (control) y con ellas, respectivamente. De esta forma se obtuvo la concentración mínima de los nanogeles que inhibe el crecimiento de las bacterias (MIC, Minimum Inhibitorial Concentration).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Modificación del ácido hialurónico

El proceso que se ha seguido para la modificación del ácido hialurónico (Lih et al., 2016) con la dopamina ha resultado ser efectivo, ya que por las pruebas de caracterización realizadas como el Folin-Ciocalteu descrito en el apartado "material y metodología" se confirma la presencia de la dopamina (grupos fenoles).

Se registró el espectro de absorbanza UV-visible (rango de 230-400 nm) de una solución de HA sin modificar y de dos soluciones de HA-DOPA sintetizado de 60 y 200 kDa (fig. 12). En el espectro de UV-visible se observa como a diferencia del espectro del polímero sin modificar (línea negra) se puede identificar una banda de absorción intensa centrada en 275 nm en las muestras de HA-DOPA. Este máximo corresponde a la presencia de moléculas de dopamina y corroboran la modificación del HA.

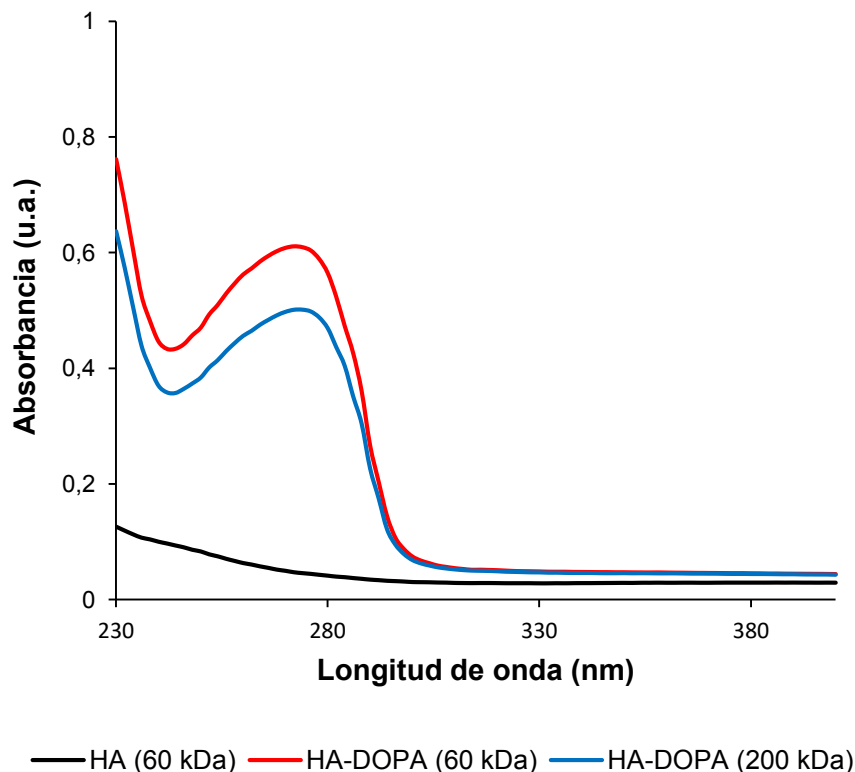


Figura 12. Gráfica del espectro de UV-Visible de HA, HA-DOPA 60 kDa y HA-DOPA 200 kDa.

4.2 Formación de los nanogeles

Después de realizar el protocolo descrito en el apartado tres y después de varios intentos fallidos o no del todo satisfactorio se ha llegado a la conclusión que cuanto más pequeño el nanogel, mejor efectividad tendrá, ya que la ratio superficie-volumen será más pequeño y sus interacciones, fuerzas y enlaces internos serán más estables. Los factores que permiten que las nanopartículas sean del menor tamaño posible son los siguientes:

- 4.2.1 **Peso molecular:** con un HA-DOPA cuyo peso molecular es de 200kDa se han obtenido nanogeles de mayores dimensiones que con un HA-DOPA de 60kDa. Esto se debe a que los polímeros son de mayor tamaño en los que tienen un peso molecular de 200kDa comparado con los que tienen 60kDa (tabla 1).

Tabla 1. Variación de la medida y potencial eléctrico en función de la concentración y tamaño del polímero de HA-DOPA.

MUESTRA	DLS (nm)	MEDIA	POTENCIAL	MEDIA (mV)
HA-DOPA 60 kDa 0,5%	367,7	360,93	-43,1	-42,4
	360,3		-41,5	
	354,8		-42,6	
HA-DOPA 60 kDa 1%	431,3	433,86	-42,9	-43,03
	436,3		-42,9	
	434		-43,3	
HA-DOPA 200kDa 0,5%	1467	1266,66	-38,7	-35,8
	1286		-35,7	
	1047		-33	
HA-DOPA 200kDa 1%	949	898,56	-57,7	-58,03
	903,6		-59	
	843,1		-57,4	

- 4.2.2 **Concentración de HA-DOPA:** desde un inicio se empezaron a sintetizar nanogeles con dos concentraciones de HA-DOPA; 1% y 0,5%. Los resultados de caracterización (Zetasizer) en la que se determinaba su medida se observaba que los que tenían una concentración de 0,5% eran de menor tamaño que los nanogeles que habían sido hechos a una concentración del 1% (tabla 1).

- 4.2.3 **Cuantificación de grupos fenoles con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu:** se preparó una recta de calibrado utilizando diferentes soluciones de dopamina como soluciones estándar. A la vez se preparó una solución de HA-DOPA de 60 kDa y 200 kDa. Una vez realizado el ensayo, se midió la

Facultat d'òptica i optometria de Terrassa

absorbancia de las muestras y mediante la recta de calibrado, se extrapola la concentración de dopamina presente en la muestra. Se obtuvo un valor de 935 y 817 μmol de dopamina por gramo de polímero para HA-DOPA de 60 y 200 kDa respectivamente. Como se podía esperar después de analizar el espectro de UV-visible de las muestras de HA-DOPA dónde el pico de absorbancia de la dopamina es mayor en la muestra de 60 kDa que en la de 200 kDa, este primero presenta un mayor grado de modificación que el de mayor peso molecular.

- 4.2.4 Disolvente orgánico: en la parte experimental se ha determinado que como disolvente es más eficaz la acetona que el etanol dado que el volumen de acetona necesario para que la turbidez deseada aparezca en la mezcla es menor y aparece más rápido. No solamente eso, sino que el grado máximo de turbidez que se llega a alcanzar en los nanogeles es mayor con acetona (imagen 12, A) que con etanol (imagen 12, B) puede apreciarse a simple vista

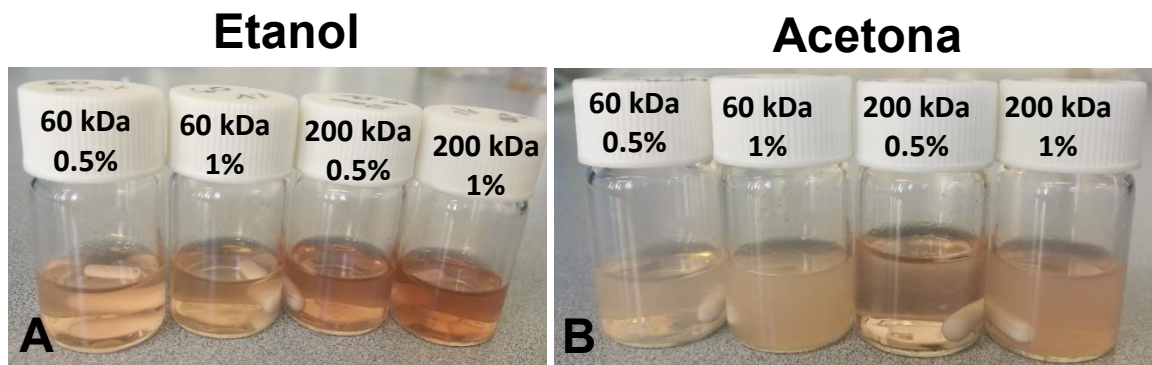


Imagen 12. Grado de turbidez que alcanzados con etanol (A) y acetona (B).

- 4.2.5 Velocidad de adición del disolvente: el HA-DOPA es un material que diluido en agua se disuelve fácilmente, pero si se pone completamente en un disolvente orgánico como lo es la acetona este precipitará de forma brusca formando grandes moléculas que no son útiles en esta investigación. Primero se intentó con una velocidad de adición de 1ml/min, pero las partículas formadas eran demasiado grandes, luego se redujo a 0,5ml/min, el resultado fue más favorable, pero aun así las partículas eran de un tamaño superior al esperado. No fue hasta que se estableció 0,2ml/min como velocidad predeterminada que empezaron a formarse los nanogeles de un tamaño igual o inferior a los 450nm.

4.2.6 Temperatura de los nanogeles: una vez se hubieron formado los nanogeles con y sin fármaco, las muestras fueron sometidas a lecturas de medida en el *Zetasizer* para ver su comportamiento a diferentes temperaturas. Independientemente del peso molecular del HA-DOPA o del disolvente orgánico empleado para su síntesis, los nanogeles de HA-DOPA siguen un claro patrón (tabla 2) de aumento de tamaño en temperaturas elevadas y un descenso de este a temperaturas más bajas. Los datos que se muestran en la tabla corresponden a los nanogeles que encapsulaban quercetina.

Tabla 2. Variación de la medida de los nanogeles en función de la temperatura. Donde Q es quercetina.

MUESTRA	DLS (nm)	MEDIA	TEMPERATURA (°C)
Q HA-DOPA 10	363,8	391,7	10
	389,6		
	421,7		
Q HA-DOPA 25	472,9	460,4	25
	527,6		
	380,7		
Q HA-DOPA 40	889,2	744,2	40
	623,8		
	719,6		
Q HA-DOPA 60	1684	1114,07	60
	755,2		
	903		
Q HA-DOPA 10 (2)	429,9	406,3	10
	395,4		
	393,6		

4.2.7 Lacasa: al inicio del proceso de síntesis de los nanogeles se determinó que la concentración de la lacasa sería 50 µL por mililitro de solución. Esto bastaba para que los nanogeles se estabilizaran. Pero cuando se hizo el cambio de disolvente de etanol a acetona la lacasa dejó de ser tan efectiva como lo era antes y los nanogeles ya no eran tan estables como lo eran antes, por lo que se decidió aumentar la concentración de la lacasa de 50 a 100 µL por mililitro de solución. Entonces los nanogeles volvieron a ser igual de estables que como lo eran con el etanol. Por otro lado, después de añadir la lacasa a la solución, esta se deja reposar posteriormente a 37°C, que es la temperatura en la cual la actividad esta enzima es más elevada.

4.2.8 Encapsulación de fármacos: la encapsulación de los fármacos ha sido finalmente posible después de conocer la solubilidad de cada uno de ellos y comprobar que se disolvían y se mezclaban correctamente cuando se formaban los nanogeles al añadir la acetona. Tal y como se ha explicado en el apartado “materiales y metodología” añadiendo los compuestos hidrófobos a la acetona se consigue “encapsular” el fármaco, en este caso el compuesto hidrófobo es la quercetina, sin embargo, este fármaco no fue exactamente encapsulado, sino que pasó a formar parte de la propia estructura del nanogel. Mientras que el diclofenaco y la gentamicina se disolvieron en el agua junto con el HA-DOPA. Estos dos si que fueron encapsulados. Por lo que se prueba que esta plataforma es apta para la encapsulación y transporte de fármacos.

4.3 Caracterización de los nanogeles:

4.3.1 Actividad antioxidante de los nanogeles: usando la técnica con DPPH que se ha explicado en el apartado “materiales y metodología” se confirma por el resultado que el HA modificado con dopamina, tanto el de 60 kDa como el de 200 kDa presentan una actividad antioxidante similar a la del control de ácido ascórbico (color amarillo) a diferencia del HA sin modificar dónde no se observa cambio de color. El cálculo del % de capacidad antioxidante determinado a partir del valor de absorbancia de las muestras y los controles corrobora lo observado en la imagen, con un valor de alrededor del 70% de capacidad antioxidante, como el control de ácido ascórbico. Como se puede observar en la fotografía (imagen 13) se aprecia que solo aquellas muestras que contenían HA-DOPA son las que han mostrado tener capacidad antioxidante.



Imagen 13. Resultados de la técnica con DPPH. 1: control negativo (no reacciona), 2: control positivo, 3: HA sin modificar, 4: HA-DOPA con peso molecular de 60 kDa, 5: HA-DOPA con peso molecular de 200 kDa.

Ahora bien, si hablamos de los nanogeles que han encapsulado fármacos los resultados podrían ser diferentes, ya que se tiene que tener en cuenta que ahora en los nanogeles ya no solo está presente el HA-DOPA, sino que también influyen

Facultat d'òptica i optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, 2021. Todos los derechos reservados

las propiedades químicas de los radicales de los fármacos encapsulados. En la fotografía (imagen 14) se muestran los resultados obtenidos. No obstante, se ve claramente como predomina la capacidad oxidante que aporta la dopamina a la plataforma.



Imagen 14. Resultados de la técnica con DPPH en nanogel con fármacos encapsulados. 1: control negativo, 2: control positivo, 3: HA-DOPA, 4: HA-DOPA/gentamicina, 5: HA-DOPA/quercetina.

Al estar formados por HA-DOPA se espera que también tengan capacidad de inhibir los radicales libres. A diferencia de lo observado con las soluciones de HA-DOPA, las soluciones de nanogel no son capaces de inhibir todo el DPPH de la solución en 1 hora. Se observa como solo la muestra con quercetina es capaz de hacer un cambio de color completo de lila a amarillo de forma inmediata. Esto indica que los nanogel de quercetina tienen una capacidad antioxidante más marcada y rápida debida a la presencia de más grupos polifenoles que provienen de este compuesto. Se demuestra así que, como se observa en la imagen, los nanogel de gentamicina y los que no tienen fármacos también son capaces de inhibir completamente el DPPH después de una noche de incubación. En el gráfico se aprecia el porcentaje de inhibición de DPPH de cada muestra de nanogel (fig. 13).

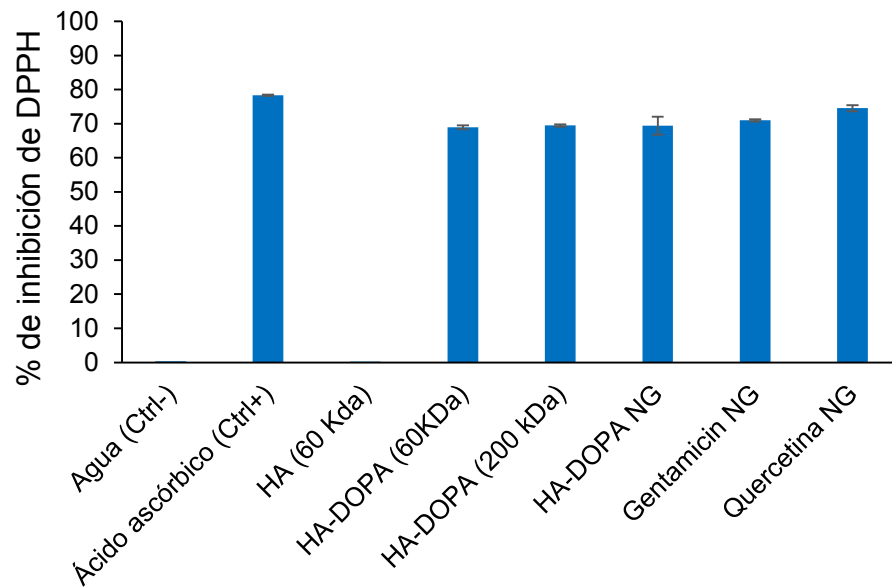


Figura 13. Porcentaje de inhibición de DPPH en función del compuesto analizado

4.3.2 Pruebas de actividad antibacteriana: se probó la actividad antimicrobiana de los nanogeles frente a *P. aeruginosa*. Las muestras que contenían gentamicina fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de la bacteria, incluso a concentraciones muy bajas, debido a que este antibiótico es muy activo frente a bacteria gramnegativa como la *Pseudomona* (Hrbacek et al., 2021), este resultado confirma la encapsulación de la gentamicina. Los nanogeles que contenía quercitina inhibieron parcialmente el crecimiento de la bacteria (fig. 14). Algunos autores han descrito que la quercitina tiene cierta actividad antimicrobiana (El Moussaoui et al., 2019). Por último, los NGs sin un compuesto activo no presentaron actividad antimicrobiana.

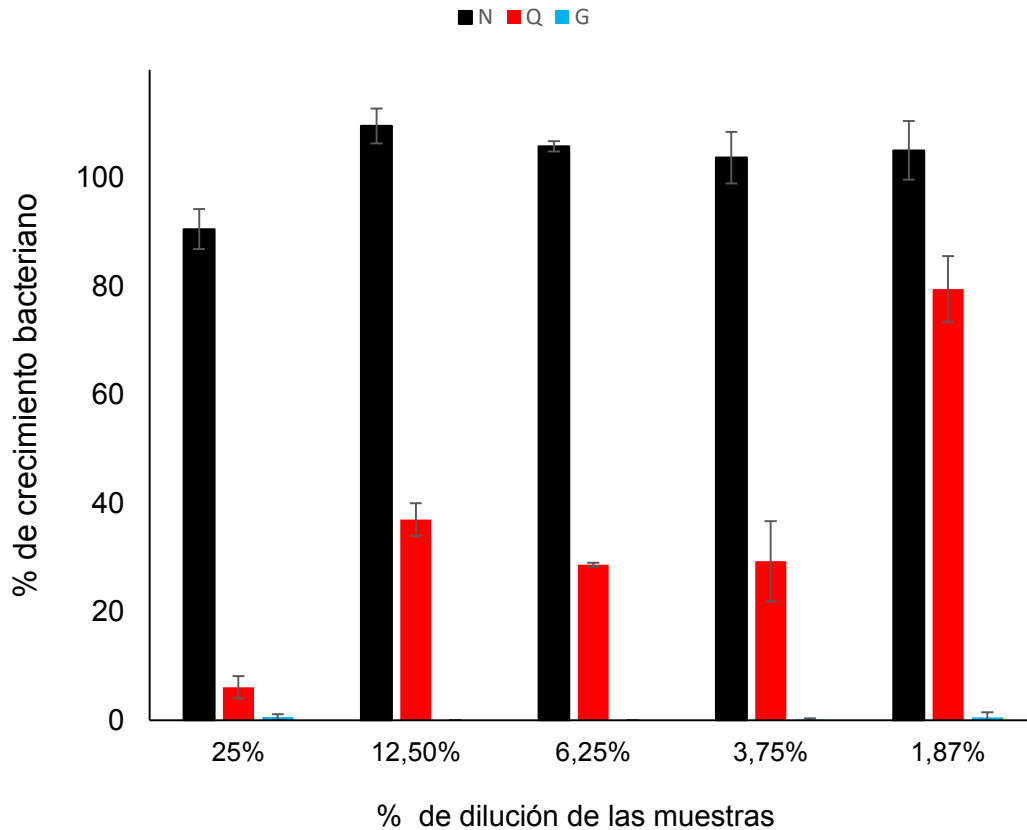


Figura 14. Gráfica de porcentaje de crecimiento bacteriano con los nanogeles. N: nanogeles sin fármacos, Q: nanogeles con quercetina, G: nanogeles con gentamicina.

4.3.3 Pruebas de biocompatibilidad: en las pruebas realizadas con las células HaCat y BJ5 α se ha demostrado que los nanogeles no son perjudiciales para éstas, es decir que no matan ni dañan las células vivas, eso quiere decir que son biocompatibles, Aunque todavía es pronto decir que con tejidos vivos oculares los nanogeles con fármacos serán igual de respetuoso con los tejidos oculares, sobre todo con la córnea, que es altamente sensible. En la gráfica (fig. 15) se muestran los valores de los porcentajes de viabilidad celular. Finalmente, se comprobó la biocompatibilidad de los materiales sintetizados in vitro. Como esperábamos, todas las muestras sintetizadas eran biocompatibles, mostrando más del 80% de viabilidad celular después del contacto directo con los nanogeles durante 24 h.

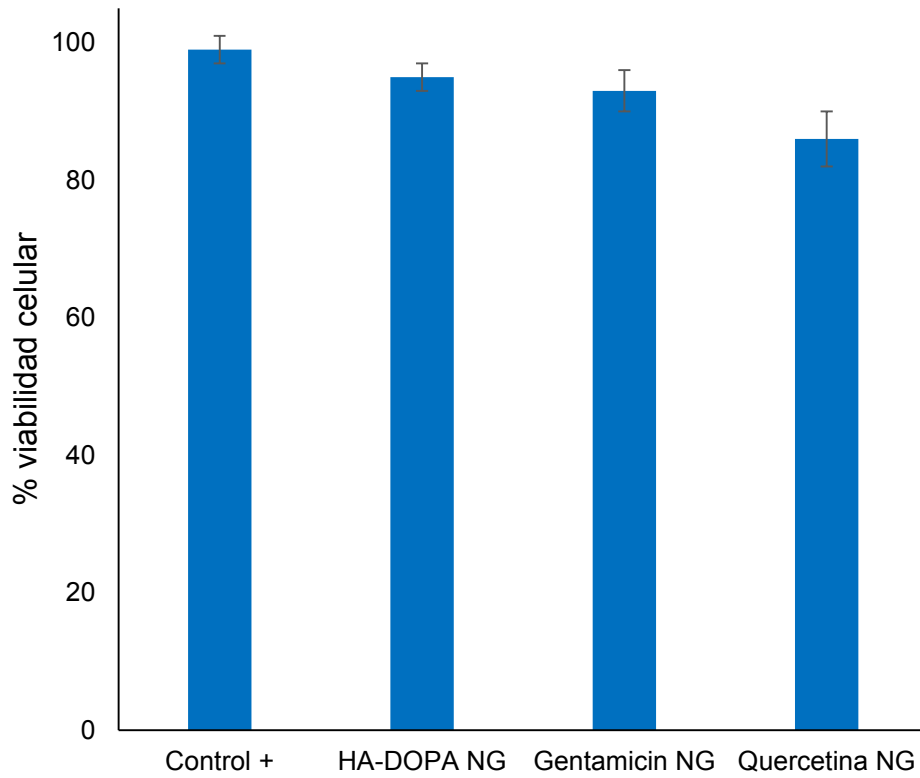


Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular en función de los nanogeles

5. CONCLUSIONES

Al final de este proyecto debe destacarse que se ha conseguido el objetivo principal que era el de diseñar y sintetizar una plataforma a base ácido hialurónico con dopamina que sirviera para el suministro de fármacos, la cual se ha conseguido mediante la modificación. Una vez obtenido el conjugado ácido hialurónico-dopamina de dos pesos moleculares (60 y 200 kDa) se llevó a cabo el método de desolvatación para formar nanocluster de HA-DOPA. Posteriormente, sin usar ningún reactivo químico sino la enzima lacasa que reaccionó específicamente con los grupos fenólicos incluidos en el polímero de dopamina, se crea una red reticulada para dar así estabilidad estructural a los nanogeles. A través del proceso de optimización de la síntesis de los nanogeles se pudo determinar que las condiciones ideales para obtener nanogeles más pequeños es con peso moléculas de 60 kDa, concentración de HA-DOPA al 0,5%, 100 µl de lacasa por mililitro de solución, entre otros resultados que ya se han explicado antes. Posteriormente se ha demostrado que los fármacos se pueden encapsular y finalmente, se ha podido demostrar que los nanogeles diseñados y sintetizados en este proyecto son biocompatibles, antioxidantes y con actividad antibacteriana, a eso se le suma que algunos de ellos tienen mayor eficacia antibacteriana, sobretodo la gentamicina, lo que es coherente, dado que este compuesto es un fármaco bactericida. Por lo que este en concreto podría tener un uso futuro como tratamiento para infecciones en oftalmología. Pero no solo en estas circunstancias sería útil, ya que al final se ha logrado sintetizar una plataforma muy versátil que es biocompatible con el ojo y con las propiedades antioxidantes que aporta la dopamina, a eso sumada la capacidad para encapsular y transportar fármacos, convierte los resultados de este proyecto con potencial, los nanogeles son excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas, sobre todo en oftalmología.

La continuación de este trabajo debería de pasar por la caracterización de la eficiencia de encapsulación de los fármacos, de la liberación de estos, de la respuesta a estímulos como pH, temperaturas, enzimas presentes en el ojo, etc. así como su interacción con las mucosas y diferentes tejidos del ojo. La evolución de estos parámetros permitiría identificar las potenciales aplicaciones oftalmológicas. De igual manera, se cree que esta plataforma es muy versátil y podría ser utilizada como recubrimiento de lentillas, en gotas, pomadas, en hidrogeles inyectables, etc.

6. BIBLIOGRAFIA

Abedi, F., Davaran, S., Hekmati, M., Akbarzadeh, A., Baradaran, B., & Moghaddam, S. V. (2021). An improved method in fabrication of smart dual-responsive nanogels for controlled release of doxorubicin and curcumin in HT-29 colon cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1) doi:10.1186/s12951-020-00764-6

Alles, N., Soysa, N. S., Hussain, M. A., Tomomatsu, N., Saito, H., Baron, R., . . . Ohya, K. (2009). Polysaccharide nanogel delivery of a TNF- α and RANKL antagonist peptide allows systemic prevention of bone loss. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(2), 83-88. doi: 10.1016/j.ejps.2009.01.002

Chan, Y. -, Liao, P. -, Tsai, C. -, Cheng, Y. -, Lin, F. -, Ho, J. -, . . . Li, C. -. (2021). Titanium dioxide nanoparticles impair the inner blood-retinal barrier and retinal electrophysiology through rapid ADAM17 activation and claudin-5 degradation. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1) doi:10.1186/s12989-020-00395-7

Diez, L. (2018). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en olivas (trabajo de final de grado). Facultad de farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España.

El Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Almehtdi, A. M., Elmsellem, H., Fikri Benbrahim, K., Boust, D., & Bari, A. (2019). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of withania frutescens.L. *Bioorganic Chemistry*, 93 doi:10.1016/j.bioorg.2019.103337

Fang, Y. -, & Yin, Z. -. (2011). Preparation of a hyaluronic acid modified bovine serum albumin nanoparticle and its anti-tumor effect. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 42(4), 480-484+502.

Fei, Z., Xin, X., Fei, H., & Yuechong, C. (2020). Meta-analysis of the use of hyaluronic acid gel to prevent intrauterine adhesions after miscarriage. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 244, 1-4. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.10.018

Hahn, S. K., Park, J. K., Tomimatsu, T., & Shimoboji, T. (2007). Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(4), 374-380. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.09.019

Hashimoto, Y., Mukai, S. -, Sasaki, Y., & Akiyoshi, K. (2018). Nanogel tectonics for tissue engineering: Protein delivery systems with nanogel chaperones. *Advanced Healthcare Materials*, 7(23) doi:10.1002/adhm.201800729

Hrbacek, J., Cermak, P., & Zachoval, R. (2021). Current antibiotic resistance patterns of rare uropathogens: Survey from central european urology department 2011–2019. *BMC Urology*, 21(1) doi:10.1186/s12894-021-00821-8

Huang, X., & Chau, Y. (2019). Investigating impacts of surface charge on intraocular distribution of intravitreal lipid nanoparticles. *Experimental Eye Research*, 186 doi: 10.1016/j.exer.2019.107711

Jun, J. Y., Nguyen, H. H., Paik, S. -. -, Chun, H. S., Kang, B. -. , & Ko, S. (2011). Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method. *Food Chemistry*, 127(4), 1892-1898. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.040

Kato, N., Hasegawa, U., Morimoto, N., Saita, Y., Nakashima, K., Ezura, Y., . . . Noda, M. (2007). Nanogel-based delivery system enhances PGE2 effects on bone formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(5), 1063-1070. doi:10.1002/jcb.21160

Klont, R. R., Eggink, C. A., Rijs, A. J., Wesseling, P., & Verweij, P. E. (2005). Successful treatment of fusarium keratitis with cornea transplantation and topical and systemic voriconazole. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(12), e110-112. doi:10.1086/430062

Li, Q., Weng, J., Wong, S. N., Thomas Lee, W. Y., & Chow, S. F. (2021). Nanoparticulate Drug Delivery to the Retina. *Molecular pharmaceutics*, 18(2), 506–521. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00224>

Lih, E., Choi, S. G., Ahn, D. J., Joung, Y. K., & Han, D. K. (2016). Optimal conjugation of catechol group onto hyaluronic acid in coronary stent substrate coating for the prevention of restenosis. *Journal of Tissue Engineering*, 7 doi:10.1177/2041731416683745

Moisa, C., Copolovici, L., Bungau, S., Pop, G., Imbrea, I., Lupitu, A., . . . Copolovici, D. (2018). Wastes resulting from aromatic plants distillation – bio-sources of antioxidants and phenolic compounds with biological active principles. *Farmacia*, 66(2), 289-295.

Rayo, O. E., & Guerrero, D. Q. (2014). Polymeric nanogels: A new alternative for drug delivery. [Nanogeles poliméricos: Una nueva alternativa para la administración de fármacos] *Revista Mexicana De Ciencias Farmaceuticas*, 45(3), 17-38.

Swetledge, S., Jung, J. P., Carter, R., & Sabliov, C. (2021). Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: Implications in ocular disease therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1) doi:10.1186/s12951-020-00745-9

Tahara, Y., & Akiyoshi, K. (2015). Current advances in self-assembled nanogel delivery systems for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 95, 65-76. doi: 10.1016/j.addr.2015.10.004

Toita, S., Sawada, S. -, & Akiyoshi, K. (2011). Polysaccharide nanogel gene delivery system with endosome-escaping function: Co-delivery of plasmid DNA and phospholipase A 2. *Journal of Controlled Release*, 155(1), 54-59. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.12.008

Torres-Martínez, A., Bedrina, B., Falomir, E., Marín, M. J., Angulo-Pachón, C. A., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2021). Non-polymeric nanogels as versatile nanocarriers: Intracellular transport of the photosensitizers rose bengal and hypericin for photodynamic therapy. *ACS Applied Bio Materials*, 4(4), 3658-3669. doi:10.1021/acscabm.1c00139

Virgolini, R., 2002. Temas de Bacteriología y Virología para CEFA. *Temas de Bacteriología y Virología para CEFA*, pp.609-629. Disponible en: <<http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Indice.htm>>.

Xu, C., Hung, C., Cao, Y., & Liu, H. H. (2021). Tunable crosslinking, reversible phase transition, and 3D printing of hyaluronic acid hydrogels via dynamic coordination of innate carboxyl groups and metallic ions. *ACS Applied Bio Materials*, 4(3), 2408-2428. doi:10.1021/acscabm.0c01300

Yang, Y. -, Lee, W. -, Kim, Y. -, & Hong, Y. -. (2021). A meta-analysis of the efficacy of hyaluronic acid eye drops for the treatment of dry eye syndrome. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 1-14. doi:10.3390/ijerph18052383

Zhang, X., Wei, D., Xu, Y., & Zhu, Q. (2021). Hyaluronic acid in ocular drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 264 doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118006

Zhao L, Wang H, Du X. The therapeutic use of quercetin in ophthalmology: recent applications. *Biomed Pharmacother.* 2021 May;137:111371. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111371. Epub 2021 Feb 6. PMID: 33561647.

Zoratto, N., Montanari, E., Viola, M., Wang, J., Coviello, T., Di Meo, C., & Matricardi, P. (2021). Strategies to load therapeutics into polysaccharide-based nanogels with a focus on microfluidics: A review. *Carbohydrate Polymers*, 266 doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118119