



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN INGENIERÍA QUÍMICA

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

AUTORA: ROSA MARÍA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

TUTOR: ALBERTO JOSÉ CAMPILLO FERNÁNDEZ

COTUTOR: ANA JESÚS VIDAURRE GARAYO

Curso Académico: 2019-2020

Índice

ÍNDICE DE LA MEMORIA DESCRIPTIVA

Resumen.....	5
Resum.....	7
Abstract.....	9
1. Objetivo.....	11
2. Introducción.....	13
2.1. Sistemas para liberación de fármacos.....	13
2.2. Tecnologías para la liberación controlada de fármacos.....	16
• Dispositivos de administración por vía oral.....	16
• Nano vehículos inyectables.....	17
• Micropartículas inyectables.....	19
• Dispositivos implantables.....	20
• Dispositivos transdermales.....	22
2.3. Biomateriales para la liberación controlada de fármacos.....	24
2.3.1 Policaprolactona.....	27
2.3.2 Óxido de grafeno.....	28
2.3.3 Dispositivos híbridos de PCL/GO.....	29
2.3.4 Incorporación de fármacos al GO.....	32
a) Enlaces covalentes.....	33
b) Enlaces de hidrógeno.....	33
c) Fisorción por interacciones $\pi - \pi$	34
d) Enlaces disulfuro.....	34
2.4. Mecanismos de degradación en dispositivos poliméricos de liberación de fármacos.....	35
2.5. Análisis de dispositivos polímero/GO para liberación de fármacos.....	40
2.6. Degradación de dispositivos basados en PCL a pH básico.....	47
3. Materiales y métodos.....	54
3.1. Materiales.....	54
3.2. Métodos.....	55
3.2.1. Síntesis del híbrido PCL/GO.....	55
• Acondicionamiento del GO.....	55
• Incorporación del fármaco al GO.....	56
• Incorporación de PCL al complejo GO(d).....	56

•	Incorporación de PCL al GO sin fármaco	57
3.2.2.	Caracterización	57
•	Ensayo de liberación del fármaco por degradación a pH 13: UV-VIS / HPLC.....	58
•	Pérdida de masa.....	59
•	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	60
•	Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). 60	
•	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	60
4.	Conclusiones.....	62
5.	Bibliografía	63

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1.	Cuadro de precios unitarios	73
1.1.	Coste de mano de obra	73
1.2.	Coste de equipos.....	73
1.3.	Coste de productos y reactivos	73
1.4.	Coste de materiales.....	74
2.	Cuadro de precios descompuestos	75
2.1.	Fabricación y degradación de las muestras	75
2.2.	Caracterización.....	77
2.3.	Limpieza de instrumentación	78
2.4.	Reuniones.....	79
2.5.	Equipos de protección individual y seguridad (EPIS)	79
3.	Presupuesto de ejecución por contrata	80

MEMORIA DESCRIPTIVA

Resumen

Este Trabajo de Fin de Máster consiste en la elaboración de un proyecto cuyo objetivo es la síntesis y caracterización de un material compuesto biodegradable formado por policaprolactona (PCL) / óxido de grafeno (GO) que pueda encontrar aplicación en el campo de la biomedicina como dispositivo de liberación de fármacos. El modelo de fármaco elegido para este proyecto es la doxorubicina (DOX), un medicamento ampliamente usado en tratamientos contra el cáncer. El método de síntesis que se ha propuesto ha surgido a raíz de una amplia búsqueda bibliográfica sobre dispositivos poliméricos con base de policaprolactona reforzados con óxido de grafeno para aplicaciones en liberación controlada.

Se ha diseñado la fabricación de unas muestras biodegradables híbridas compuestas por PCL y GO al 0.01% en masa. Previamente a la síntesis del complejo híbrido PCL/GO, se incorporará el fármaco al GO. También se fabricarán muestras híbridas sin el fármaco. Todas las muestras se someterán a un ensayo de degradación acelerada a pH 13 y se medirá la pérdida de masa, así como la cantidad de fármaco liberada con espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los cambios morfológicos en las muestras se analizarán mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y se observará la presencia de interacciones entre el complejo híbrido y el fármaco mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR). Las propiedades térmicas del material se estudiarán mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Palabras clave: policaprolactona (PCL), óxido de grafeno (GO), doxorubicina (DOX), fármaco, liberación controlada, degradación

Resum

Aquest Treball de Fi de Màster consisteix en l'elaboració d'un projecte amb l'objectiu de la síntesi i caracterització d'un material compost biodegradable format per policaprolactona (PCL) / òxid de grafè (GO) que pugui trobar aplicació al camp de la biomedicina com a dispositiu d'alliberament de fàrmacs. El model de fàrmac triat per a aquest projecte és la doxorubicina (DOX), un medicament àmpliament usat en tractaments contra el càncer. El mètode de síntesi que s'ha proposat ha sorgit arran d'una àmplia recerca bibliogràfica sobre dispositius polimèrics amb base de policaprolactona reforçats amb òxid de grafè per a aplicacions en alliberament controlat.

S'ha dissenyat la fabricació d'unes mostres biodegradables híbrides compostes per PCL i GO amb el 0,01% en massa de GO. Prèviament a la síntesi de l'complex híbrid PCL / GO, s'incorporarà el fàrmac al GO. També es fabricaran mostres híbrides sense fàrmac. Totes les mostres s'han de sotmetre a un assaig de degradació accelerada a pH 13 i es mesurarà la pèrdua de massa, així com la quantitat de fàrmac alliberada amb espectroscòpia ultraviolada visible (UV-VIS) i cromatografia líquida d'alt rendiment (HPLC). Els canvis morfològics en les mostres s'analitzaran mitjançant microscòpia electrònica de rastreig d'emissió de camp (FESEM) i s'observarà la presència d'interaccions entre el complex híbrid i el fàrmac mitjançant espectroscòpia d'infrarojos per transformada de Fourier (FTIR). Les propietats tèrmiques del material s'estudiaran mitjançant calorimetria diferencial (DSC).

Paraules clau: policaprolactona (PCL), òxid de grafè (GO), doxorubicina (DOX), fàrmac, alliberament controlat, degradació

Abstract

This Master's Thesis is about the development of a project of which the aim is to synthesize a biodegradable material made of polycaprolactone (PCL) / Graphene oxide (GO) to be used in the field of biomedicine as a drug delivery system. The drug model chosen for this project is doxorubicin (DOX), which has extensively been used in chemotherapy treatment. The preparation of the samples here suggested, emerged from a broad bibliographic research on polymer devices based on polycaprolactone, reinforced with graphene oxide for controlled delivery applications.

The fabrication of the biodegradable hybrid samples consists of PCL and 0,01% wt GO. Prior to the synthesis of the PCL/GO samples, the drug will be anchored onto the GO. Additionally, some PCL/GO samples will be synthesized without the drug. All the samples will undergo an accelerated degradation test at pH 13 and the weight loss will be measured, as well as the amount of released drug which will be determined by Ultraviolet-Visible spectroscopy (UV-VIS) and by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The morphological changes in the samples will be analyzed by Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) and the presence of interactions between the hybrid complex and the drug will be observed by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR). The material's thermal properties will be studied by Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Keywords: polycaprolactone (PCL), Graphene oxide (GO), doxorubicin (DOX), drug, delivery, release, controlled, degradation

1. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es la elaboración de un proyecto sobre la síntesis y caracterización de dispositivos biodegradables de policaprolactona (PCL) / óxido de grafeno (GO) con aplicación en sistemas de liberación de fármacos. La metodología de este proyecto abarcará un análisis exhaustivo de revisión bibliográfica, así como el diseño y método de fabricación de híbridos PCL/GO -incluyendo el anclaje de biomoléculas al GO-, un ensayo de degradación en medio básico para obtener el perfil de liberación del fármaco y la caracterización de los híbridos antes, durante y después del ensayo de degradación.

Un dispositivo de liberación de fármacos de PCL pura presentaría aspectos mejorables: propiedades mecánicas, solubilización de moléculas (dada su extrema hidrofobicidad) y poca versatilidad en rutas de anclaje de moléculas terapéuticas. Por tanto, una estrategia novedosa es la fabricación de soportes híbridos con base de policaprolactona, que asegure una buena y duradera interacción biológica, y un refuerzo inorgánico, como el óxido de grafeno (GO), que permite mejorar las propiedades mecánicas, hidrofobicidad del dispositivo y el anclaje de fármacos por diferentes vías, buscando como objetivo un control exhaustivo del perfil de liberación.

Los objetivos específicos para llevar a cabo este proyecto se resumen en los siguientes puntos:

1. Incorporación del fármaco al óxido de grafeno

La doxorubicina, un fármaco empleado en terapia contra el cáncer, se incorporará a un soporte de óxido de grafeno mediante sonicación por formación de interacciones $\pi - \pi$.

2. Síntesis de las muestras

Se sintetizarán unas muestras híbridas de policaprolactona con 0.01 % en masa de óxido de grafeno y con el fármaco previamente incorporado al GO (PCL/GO(d)), así como muestras híbridas sin fármaco (PCL/GO).

3. Ensayo de degradación de las muestras

Las muestras se someterán a una degradación hidrolítica a pH 13, con el objetivo de acelerar el proceso de biodegradación natural del material (la degradación de la policaprolactona puede durar hasta 3 años en pH neutro) y poder estudiar la velocidad de liberación del fármaco *in vitro*.

4. Caracterización de las muestras

Se realizará una caracterización de los híbridos PCL/GO(d) y PCL/GO, previamente a la degradación hidrolítica para estudiar las propiedades químicas y físicas de las muestras, y durante el proceso de degradación para obtener el perfil de liberación del fármaco.

2. Introducción

2.1. Sistemas para liberación de fármacos

Los sistemas de liberación de fármacos son tecnologías de ingeniería para la administración dirigida y / o la liberación controlada de agentes terapéuticos. Los fármacos se han usado durante mucho tiempo para mejorar y prolongar la salud, pero el suministro de fármacos ha cambiado drásticamente en los últimos años y se prevén cambios aún mayores en un futuro cercano, que permitan suministrarlos de manera más controlada y dirigida a sitios específicos del organismo.

La ingeniería biomédica ha contribuido al desarrollo de una serie de nuevos métodos de administración de fármacos que han comenzado en la práctica clínica. Así, algunos sistemas actuales de liberación de fármacos son capaces de controlar la cinética a la que se libera el medicamento y el lugar del cuerpo en el que se libera^[1]. Para ello, se emplean materiales que permiten una velocidad constante de liberación controlada (liberación de orden cero), manteniéndola dentro de la ventana terapéutica y evitando así las ineficiencias de los sistemas tradicionales de suministro, donde se dan picos y valles de concentración del fármaco en el plasma sanguíneo ^[2] (Figura 1).

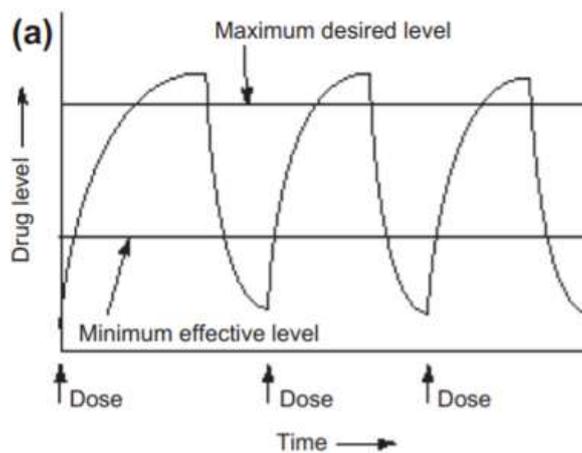


Figura 1. Curva farmacocinética típica para múltiples dosis de fármaco con cápsulas orales o inyecciones ^[3]

En la Figura 1, se puede ver que el nivel de fármaco en el plasma sanguíneo, al tomar una única dosis, crece rápidamente hasta llegar a un máximo para después disminuir gradualmente mientras el fármaco es metabolizado y eliminado. La figura también muestra el nivel máximo de concentración a partir del cual se producen efectos secundarios indeseados (como toxicidad) y la concentración mínima por debajo de la cual el fármaco no tiene efecto terapéutico. Al suministrar una única dosis de fármaco, el tiempo durante el cual la concentración del fármaco se encuentra por encima del nivel mínimo efectivo puede alargarse aumentando la cantidad de la dosis. Sin embargo, esto causaría un aumento en la concentración en el plasma sanguíneo, pudiendo llegar a sobrepasar el nivel máximo deseado, entrando en la región tóxica.

De esta forma, los sistemas de liberación controlada de fármacos proporcionan el beneficio de reducir la cantidad total del medicamento requerida para alcanzar la eficacia terapéutica, alcanzando un nivel estable de concentración en el plasma. Estos sistemas de liberación se denominan “sistemas de orden cero” (Figura 2), ya que son capaces de liberar el fármaco a una velocidad constante. ^[3]

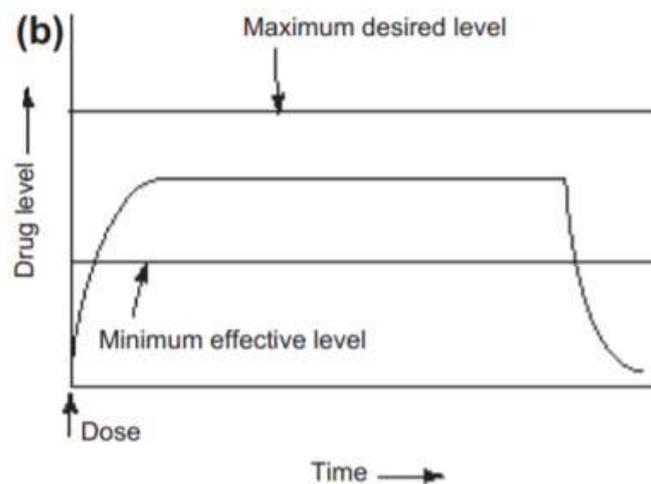


Figura 2. Curva farmacocinética de orden cero para una dosis de fármaco mediante un dispositivo de liberación controlada. ^[3]

La cuestión central es en qué casos conviene emplear los sistemas de liberación de fármacos y qué tipo de sistema conviene emplear para cada uno. Una de las propiedades más importantes a tener en consideración es el balance entre el potencial terapéutico del fármaco y la dosis a cargar en el sistema de liberación. Como norma general, cuanto mayor

sea la potencia terapéutica del fármaco, menor cantidad de moléculas de fármaco deberán incorporarse en el dispositivo de liberación. Además, se deben tener en cuenta propiedades adicionales como la estabilidad, la solubilidad y el peso molecular del mismo. ^[5]

En un sistema de suministro convencional (mediante cápsulas o inyecciones) hay que tener en cuenta que muchos medicamentos dan lugar a efectos secundarios indeseables debido a que el fármaco interactúa con partes del cuerpo que no son el objetivo del mismo o al empleo de cantidades demasiado altas para conseguir el efecto terapéutico deseado, dando lugar a problemas de toxicidad y afectando a su metabolización y eliminación. ^[6]

Los efectos secundarios limitan la capacidad de diseñar tratamientos farmacológicos óptimos para muchas enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades infecciosas. Dependiendo de los medicamentos, la forma en que se administran y cómo responde el cuerpo, pueden aparecer distintos efectos secundarios que varían mucho en función de la persona, en tipo y gravedad.

La liberación de fármacos de forma local en lugar de sistémica (con afectación a todo el organismo) es una forma común de disminuir los efectos secundarios y la toxicidad de estos, mientras se maximiza el impacto del tratamiento. Por ejemplo, una pomada antibacteriana tópica para una infección localizada, o una inyección de cortisona en una articulación dañada, puede evitar algunos de los efectos secundarios sistémicos de estos medicamentos. ^[1]

2.2. Tecnologías para la liberación controlada de fármacos

Los fármacos se pueden administrar de varias maneras: por vía oral, por inhalación, por absorción a través de la piel o por vía parenteral. Cada método tiene ventajas y desventajas y no todos se pueden usar con un medicamento concreto.

- Dispositivos de administración por vía oral

La administración de medicamentos por vía oral sigue siendo la manera más popular y utilizada de llevar a cabo una terapia. Esta ruta de administración representa un área importante de innovación en formulaciones farmacéuticas, donde hay una necesidad de mantener la estabilidad de los nuevos fármacos biomoleculares, aumentar la solubilidad y absorción de los fármacos hidrofóbicos y mejorar la biodisponibilidad de ambos tipos de fármacos.

Los mecanismos de liberación de fármacos mediante formas orales de liberación controlada pueden clasificarse en cinco categorías principales según el mecanismo que controla la liberación: ^[7] ^[8]

1. **Control por difusión:** el fármaco se encuentra cubierto por una membrana polimérica insoluble en agua y se libera por difusión debido al gradiente de concentración que se genera a ambos lados de la membrana polimérica.
2. **Control por disolución e hinchamiento:** el fármaco se encuentra en una matriz polimérica hidrofílica que se disuelve progresivamente, permitiendo la liberación del fármaco.
3. **Control por bomba osmótica:** el fármaco está rodeado de una membrana semipermeable que permite la difusión de fluido hacia el interior del comprimido, bombeando como consecuencia el fármaco fuera del comprimido a través de una pequeña abertura.

4. **Control por intercambio iónico:** el fármaco se encuentra rodeado de un polímero insoluble en agua con grupos funcionales ionizables. El fármaco comienza a liberarse cuando estos grupos funcionales entran en contacto con los iones adecuados.

 5. **Control por enzima bacteriana:** el fármaco es liberado cuando enzimas bacterianas específicas disuelven el recubrimiento. Un ejemplo de sistema de liberación controlada que utiliza este mecanismo es CODES™, dirigido a curar enfermedades del intestino mediante la liberación del fármaco por acción de las enzimas bacterianas del colon.
- Nano vehículos inyectables

Encontrar el vehículo adecuado para los medicamentos ayuda a garantizar que lleguen a su destino intactos. Los sistemas de liberación de fármacos nanométricos consisten en dispersiones coloidales de nanopartículas que contienen el medicamento. Los nano vehículos cargados con el fármaco son entonces incorporados por las células mediante endocitosis.

La mayoría de los sistemas de liberación de fármacos nanométricos están diseñados para actuar en tumores, aunque también existen otros objetivos celulares específicos en el cuerpo que pueden atacarse con estos sistemas.

Los nano vehículos transportadores de fármacos son inyectados de forma intravenosa y distribuidos a través de la circulación, donde pueden ser absorbidos por el tejido tumoral mediante una “focalización pasiva”, que consiste en la absorción de las moléculas de fármaco a través del endotelio agujereado que caracteriza a los vasos sanguíneos de los tumores y su acumulación en las células cancerígenas. Un tipo de nano vehículo de

focalización pasiva es Abraxane®, un compuesto quimioterapéutico formado por paclitaxel unido a albúmina en forma de nanopartículas. [9] [10]



Figura 3. Abraxane® para el tratamiento de cáncer

A pesar de que existen prometedores fármacos con gran potencial, muchos de estos medicamentos presentan baja estabilidad y una administración ineficiente, por lo que requieren múltiples dosis^[11]. Es por ello por lo que existen estrategias de focalización para mejorar la acción del fármaco. Estas estrategias se basan en la incorporación de ligandos de focalización (proteínas, oligopéptidos, vitaminas o polisacáridos) en la superficie del nano vehículo para propiciar la endocitosis de las células cancerígenas o malignas a través de los receptores celulares, como se muestra en la Figura 4. Esta técnica recibe el nombre de “focalización activa” y sirve para mejorar la selectividad en la liberación del fármaco.^[12]

Un ejemplo de fármaco que se suministra por un sistema de focalización activa es la doxorubicina. Dependiendo de dónde se encuentre el tumor, se le incorporarán unos ligandos específicos al fármaco. Por ejemplo, el ligando “Anti-HER-2 MAb” va dirigido a las células cancerígenas mamarias MCF-7 y BT-474. [10]

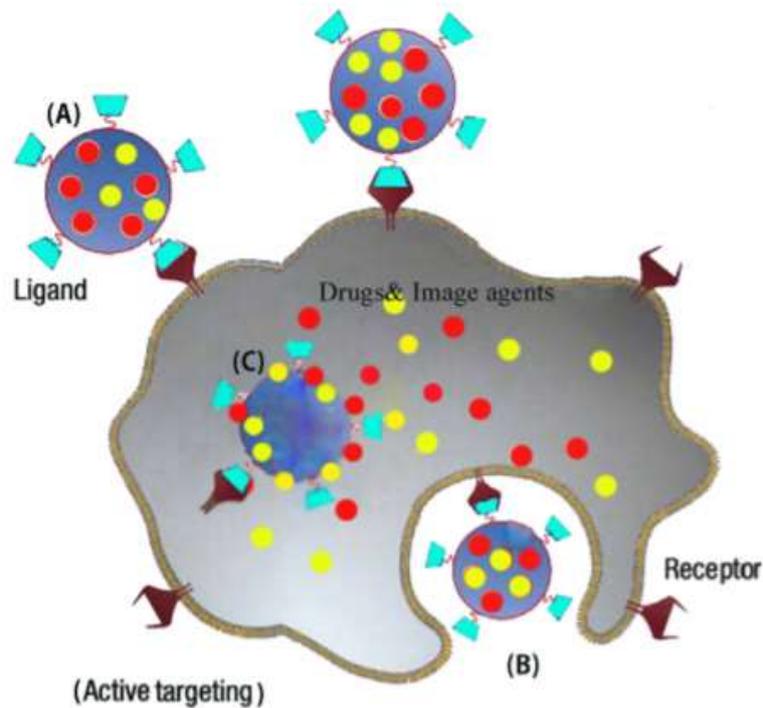


Figura 4. Representación esquemática de la focalización activa. (A) Los ligandos en la superficie del nano vehículo se unen a los receptores celulares. (B) Endocitosis de la micropartícula mediada por el receptor celular y el ligando. (C) El nano vehículo ha entrado en la célula y libera el fármaco en su interior. ^[13]

La investigación actual apunta a desarrollar nanopartículas compuestas de virus modificados que puedan administrar medicamentos de quimioterapia directamente a los tumores. Tal avance reduciría los efectos secundarios graves asociados con el tratamiento del cáncer. Hechas de virus modificados, las nanopartículas virales aprovecharían las formas naturales en que los virus se desarrollan para traspasar las defensas inmunitarias y entrar en la célula.^[1]

- Micropartículas inyectables

Los sistemas de almacenamiento inyectables consisten en micropartículas de polímero biodegradable formando una matriz en la que se encuentra disuelto el fármaco. De esta forma, se depositan las micropartículas de polímero y fármaco en el tejido dañado y el medicamento se administra a medida que el polímero se degrada. ^[14]

La liberación del fármaco desde los sistemas de micropartículas inyectables puede controlarse mediante una serie de mecanismos, como la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica y fuera de ella, la erosión superficial del polímero y el hinchamiento y degradación volumétrica del polímero por acción del medio acuoso. La erosión suele deberse a la hidrólisis de la cadena polimérica, siendo la degradación enzimática algo poco común. A menudo, la velocidad de liberación del fármaco viene determinada por una combinación de los mecanismos de degradación superficial y volumétrica. ^[15]

Además, un aspecto a tener en cuenta es que el estado físico de las micropartículas cambia a medida que se degradan, lo cual puede complicar la cinética de liberación del medicamento. Esto fue observado por Park ^[16] en la degradación de microesferas poliméricas por vía hidrolítica. El hinchamiento experimentado por las microesferas causó un cambio en la estructura del polímero y disminuyó la temperatura de transición vítrea (T_g), pasando el polímero de estado vítreo a estado gomoso. Esto causó un aumento en la velocidad de degradación del polímero.

Un ejemplo de fármaco formado por microesferas inyectables es la triptorelina, con nombre comercial Decapeptyl[®], empleado para tratar el cáncer de próstata en el varón y la endometriosis en la mujer.



Figura 5. Decapeptyl[®] para el tratamiento del cáncer de próstata y endometriosis

- Dispositivos implantables

Los dispositivos poliméricos implantables para la liberación controlada de fármacos pueden clasificarse en implantes pasivos e implantes activos. Los implantes pasivos pueden ser

biodegradables y no biodegradables, mientras que los implantes activos requieren energía para promover la liberación del fármaco.

- **Implantes pasivos:** Normalmente, se tratan de dispositivos sin parte móvil capaces de liberar el fármaco simplemente gracias a la difusión pasiva. Los implantes no biodegradables suelen estar compuestos de siliconas (poliuretanos, poliacrilatos o copolímeros como el etilvinilacetato)^[17]. Este tipo de implantes pueden ser de tipo reservorio, cuando el implante contiene en su núcleo un fármaco cubierto por una membrana permeable y no biodegradable, o de tipo monolítico, cuando el implante está formado por una matriz polimérica dentro de la cual el fármaco se encuentra disperso. Una de las aplicaciones más frecuentes de los implantes de liberación de fármacos no biodegradables son los implantes contraceptivos. El inconveniente que tienen es que deben ser retirados del cuerpo una vez que el fármaco se ha liberado por completo.^[18]

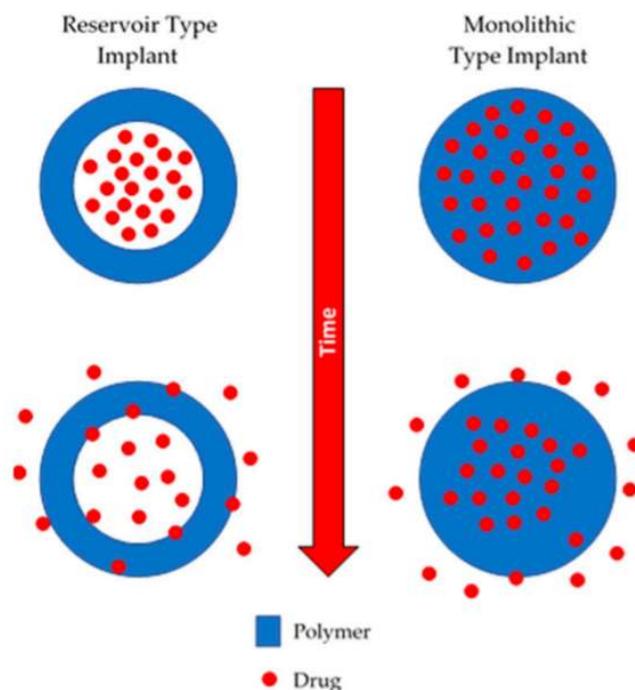


Figura 6. Esquema de los implantes de tipo reservorio y monolítico ^[17]

Los implantes pasivos biodegradables se desarrollaron para suplir los inconvenientes de los implantes no biodegradables. Se trata de dispositivos formados por polímeros que pueden degradarse en pequeños fragmentos y ser absorbidos o excretados por el cuerpo.

Normalmente, están fabricados con policaprolactona, (PCL), poli (ácido láctico), (PLA), o poli (ácido glicólico), (PGA)^[17].

- **Implantes activos:** Estos implantes cuentan con una fuerza motriz para liberar el fármaco, por lo que presentan un control más preciso de la liberación. La mayoría consisten en dispositivos electrónicos metálicos, aunque también los hay poliméricos, como las bombas osmóticas. Las bombas osmóticas poliméricas están formadas por una membrana semipermeable que se encuentra rodeando un reservorio donde se sitúa el fármaco. Los gradientes osmóticos permitirán la entrada de fluido en el implante y esto causará un aumento de la presión dentro del implante, obligando al fármaco a abandonar el dispositivo a través de un orificio. Este sistema permite una liberación controlada del fármaco con cinética de orden cero.

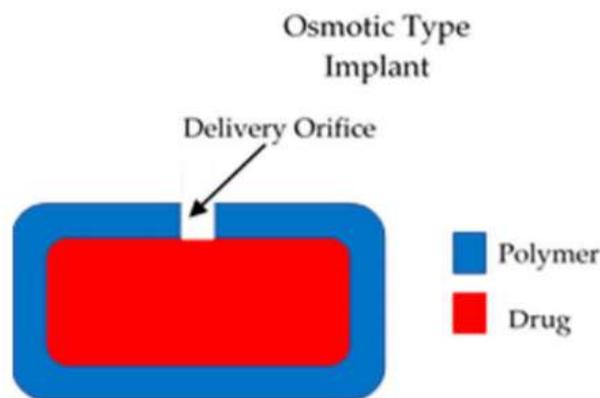


Figura 7. Esquema de un implante activo osmótico para la liberación controlada de fármacos ^[17]

- Dispositivos transdermales

Los dispositivos de liberación de fármacos transdermales se dividen en sistemas pasivos y sistemas activos, según la clasificación de Cleary G. ^[12].

- **Dispositivos transdermales pasivos:** se trata de sistemas que dependen de la difusión molecular del fármaco a través de la epidermis. Estos sistemas son adecuados para la administración de fármacos pequeños, potentes y preferiblemente lipofílicos.

- **Dispositivos transdermales activos:** estos sistemas utilizan algún tipo de energía mecánica o electromagnética para crear microporos o caminos en la epidermis y así permitir la administración de fármacos con biomoléculas grandes.

Las matrices de microagujas son un ejemplo de método para administrar medicamentos a través de la piel. En estas matrices, docenas de agujas microscópicas, cada una mucho más delgada que un cabello, pueden recubrirse o llenarse de un fármaco. Las agujas son tan pequeñas que, aunque penetran la piel, no llegan a los nervios, administrando así medicamentos sin dolor. ^[1]

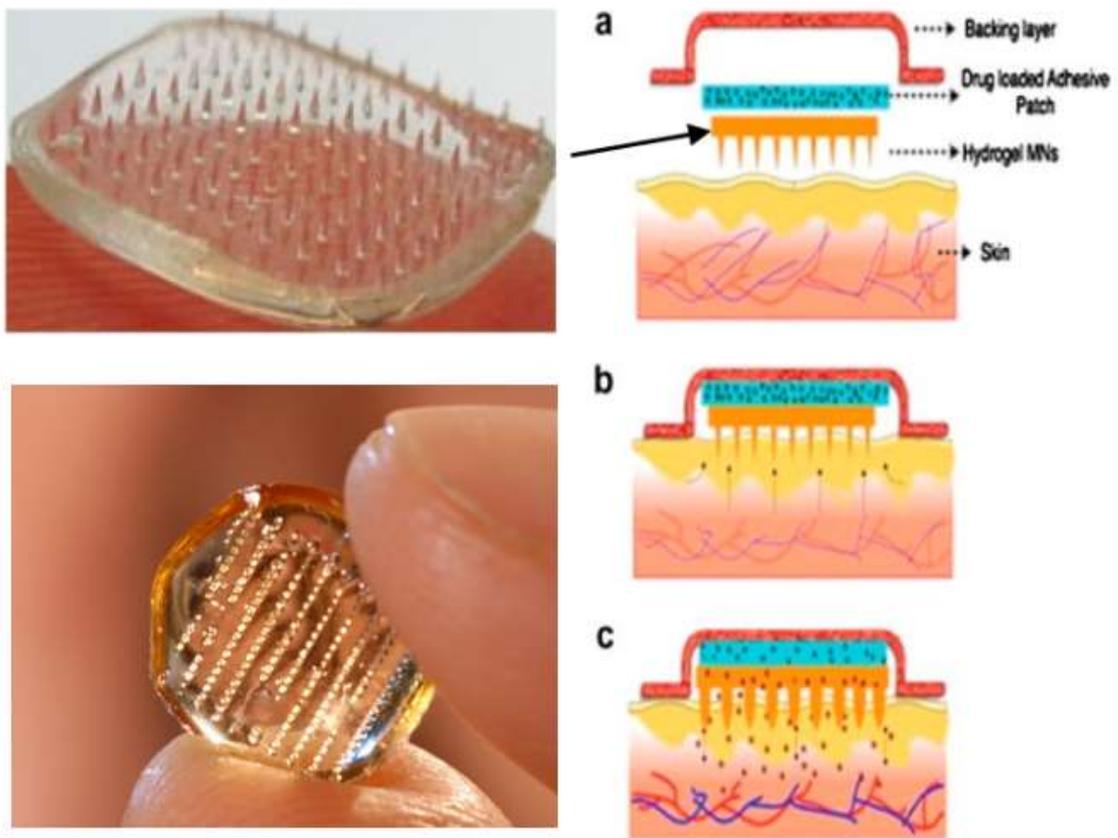


Figura 8. Dispositivo transdermal pasivo para la liberación controlada de fármacos. (a) Vista expandida del dispositivo compuesto por una capa externa, un parche adhesivo con el fármaco incorporado y una matriz de microagujas de hidrogel. (b) Aplicación del dispositivo en la superficie de la piel. (c) Difusión de agua en las microagujas de hidrogel dando lugar a un hinchamiento controlado de la matriz y a la difusión de las moléculas de fármaco. ^[19]

2.3. Biomateriales para la liberación controlada de fármacos

En la mayoría de los sistemas de liberación de fármacos, los biomateriales que sirven como vehículo para transportar los medicamentos son polímeros. En este tipo de aplicación, el principal requerimiento es que los vehículos poliméricos sean degradables. La mayoría de los polímeros degradables contienen enlaces lábiles en su cadena polimérica, por ejemplo, ésteres, ortoésteres, anhídridos, carbonatos, amidas, uretanos o ureas. La hidrofiliidad, cristalinidad y labilidad para metabolizar la matriz polimérica son claves en la determinación del perfil de liberación del fármaco. Un sistema degradable también minimiza el riesgo de toxicidad a largo plazo o de rechazo inmunológico del dispositivo polimérico, en contraposición con los sistemas no biodegradables. Por último, la velocidad de degradación de la matriz polimérica en estos dispositivos sirve para modular el perfil de liberación del fármaco. ^[20]

Los requerimientos de diseño de los biomateriales para aplicaciones en la liberación controlada de fármacos son ^[21]:

- La incorporación adecuada del fármaco dentro del material huésped para obtener perfiles de liberación prolongados, requeridos para alcanzar la eficacia terapéutica.
- La protección del medicamento para impedir su liberación incontrolada *in vivo*, al mismo tiempo que se mantiene la actividad biológica.
- La liberación predecible a lo largo del régimen terapéutico en un rango de días a años.

Además, los productos de degradación de estos materiales no deben provocar inflamación o toxicidad y deberán ser eliminados del cuerpo por medio de vías metabólicas, sin necesidad de extraer el dispositivo quirúrgicamente. La velocidad de degradación y la concentración de productos de degradación en los tejidos que rodean al implante deben permanecer a un nivel tolerable en todo momento.

Los polímeros sintéticos biodegradables más empleados como vehículos de retención y liberación de fármacos son: ^[22], ^[23]

- **Polianhídridos:** Los polianhídridos están formados por monómeros unidos por enlaces anhídrido hidrolíticamente lábiles que dan lugar a dos ácidos carboxílicos a través de una hidrólisis. El mecanismo de erosión superficial hace posible la obtención de perfiles de liberación de orden cero, al mismo tiempo que se permite el control de la velocidad y la duración de la liberación de los medicamentos. Los polímeros polianhídridos presentan una excelente biocompatibilidad *in vivo*.
- **Polihidroxicanoatos (PHA):** Los PHAs son poliésteres alifáticos producidos por una serie de bacterias como material de reserva de carbono. Debido a la versatilidad de las estructuras posibles de PHA, podría desarrollarse un amplio rango de sistemas de liberación de fármacos, incluyendo filmes (parches), microsferas y sistemas de tubos.
- **Poli (ácido láctico) (PLA) y poli (ácido glicólico) (PGA):** Para los dispositivos empleados en el cuerpo humano, los polímeros deben tener una alta biocompatibilidad, así como una biodegradabilidad modulable. El grupo de polímeros más estudiados en cuanto a estos aspectos es el PLA y sus derivados. Estos polímeros son degradados mediante hidrólisis de los enlaces éster para dar lugar a los monómeros que constituyen el polímero, los ácidos láctico y glicólico, respectivamente. La disolución y biocompatibilidad de estos polímeros permitió su uso como suturas reabsorbibles desde la década 1970, bajo los nombres comerciales de Dexon™ (PGA) y Vicryl™ o Polyglactin 910™ (PLGA).



Figura 9. Suturas abosrbibles Vicryl™ a la izquierda y Polyglactin 910™ a la derecha. [24]

- **Poli (ϵ -caprolactona) (PCL):** La PCL es un polímero hidrofóbico y cristalino usado para administrar drogas terapéuticas y factores de crecimiento en forma de microesferas y membranas porosas.

En función del periodo de tiempo durante el cual se necesita el suministro del fármaco, se emplearán polímeros con distinta hidrofiliidad, teniendo en cuenta que cuando la hidrofiliidad aumenta, el agua difunde más fácilmente en el polímero y la hidrólisis es más rápida, acelerando la degradación (Figura 10).

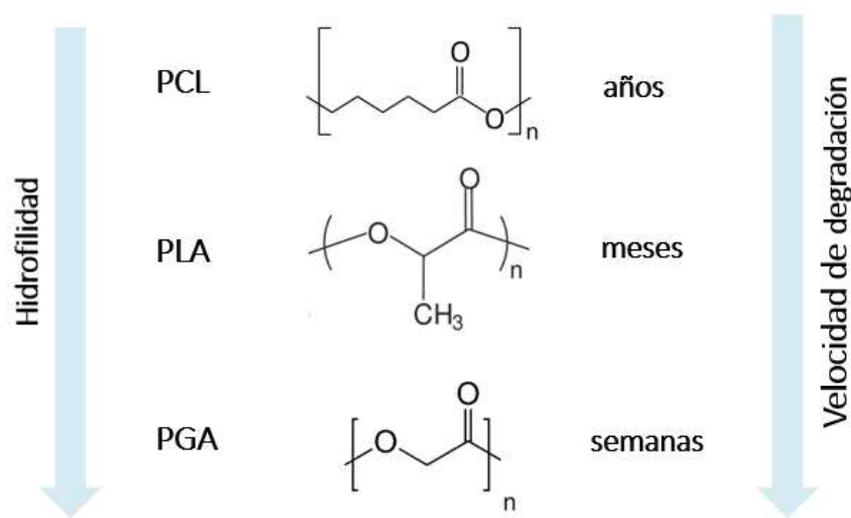


Figura 10. Velocidad de degradación e hidrofiliidad de distintos polímeros biodegradables.

La ventaja que supone la degradación lenta de la PCL es que puede emplearse para el tratamiento de cánceres que requieren dosis pequeñas de quimioterapia durante un periodo prolongado (de 2 a 3 años), como en el caso de la leucemia linfocítica aguda (ALL) en niños. ^[25]

2.3.1 Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático biodegradable, hidrofóbico y semicristalino con baja temperatura de fusión (59-64 °C) y con una baja temperatura de transición vítrea, en torno a los -60°C, por lo que, a temperatura ambiente, la PCL de cadena corta es amorfa y blanda. Su cristalinidad tiende a disminuir cuando aumenta el peso molecular. Es obtenido a partir de la polimerización de la caprolactona. La PCL se prepara por polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona empleando un catalizador como el octanato de estaño.^[19]

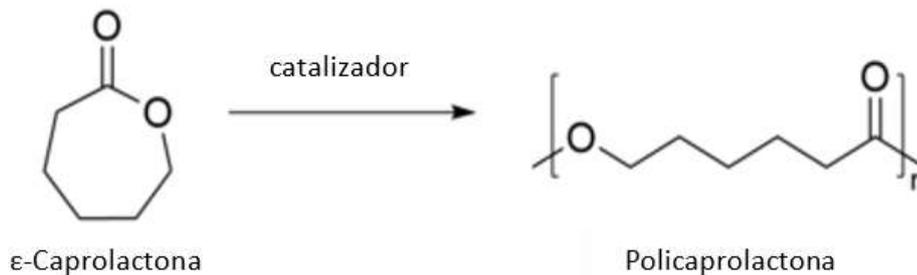


Figura 11. Reacción de polimerización de la Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) fue uno de los primeros polímeros sintetizados por el grupo de Carothers a principio de la década de los 30 del siglo pasado. La buena solubilidad de la PCL y su bajo punto de fusión han promovido una extensa investigación en las potenciales aplicaciones de este polímero en el campo de la biomedicina^[26]. La principal ventaja de la PCL sobre otros biopolímeros reside en sus excelentes propiedades reológicas y viscoelásticas, que facilitan su manipulación y manufactura de *scaffolds* para aplicaciones en ingeniería tisular.^[27]

Debido a su semi-cristalinidad y naturaleza hidrofóbica, la PCL manifiesta una velocidad de degradación muy lenta (de 2 a 3 años dependiendo del peso molecular) y tiene propiedades mecánicas deseables para una gran variedad de aplicaciones. Este biopolímero es un material aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), la agencia de los EEUU que permite la puesta en el mercado de productos sanitarios y medicamentos, de modo que ha sido usado clínicamente como dispositivo de liberación de fármacos y material de sutura desde 1980.

Comparado con otros poliésteres alifáticos lineales como el poli (ácido glicólico) (PGA) o el poli (ácido láctico) (PLA), la PCL presenta diferencias distintivas en cuanto a las propiedades físicas que resultan atractivas para los investigadores. En primer lugar, la PCL no tiene isómeros como la PLA, que presenta diferentes formas (PDLA, PLLA y combinaciones de ambos). En consecuencia, la degradación biológica y los puntos de fusión de las variantes de la PLA son distintos. En cambio, el punto de fusión de la PCL es sustancialmente menor que el de la PGA, la PLA y sus combinaciones, lo cual es probablemente un reflejo de la gran polaridad y potencial para formar enlaces de hidrógeno de la PLA y la PGA, comparado con la PCL.

La hidrólisis de los enlaces éster de la PCL puede llevarse a cabo en condiciones fisiológicas como las que se dan en el cuerpo humano. La degradación enzimática de la PCL también es posible, ya que existen estudios que han reportado que la esterasa y otros tipos de lipasas son capaces de degradar este polímero. ^[27]

2.3.2 Óxido de grafeno

El óxido de grafeno (GO) tiene una estructura de grafeno oxidado con grupos hidroxilo, carboxilo y epoxi. Se trata de un material muy versátil, ya que puede dispersarse en agua y en diversos solventes polares. Existen varios métodos para sintetizar óxido de grafeno, y las propiedades y aplicaciones dependen del grado de oxidación. Un óxido de grafeno con alto grado de oxidación (50-55%) sirve de soporte para catalizadores metálicos, mejorando drásticamente la actividad catalítica. ^[28]

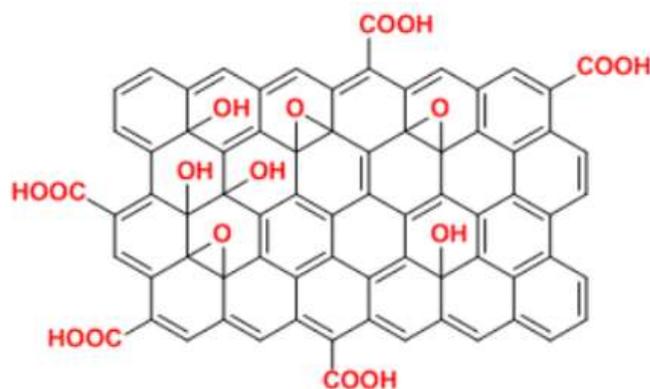


Figura 12. Estructura química del óxido de grafeno ^[28]

Los nanomateriales basados en el carbono son muy prometedores en el campo de la biomedicina. Se ha demostrado en numerosos estudios que el óxido de grafeno es un buen sustrato en aplicaciones de biomedicina gracias a sus propiedades fisicoquímicas únicas, gran área superficial, alta dispersabilidad e hidrofiliidad. Además, el GO es capaz de promover interacciones biológicas debido a su elevada superficie de grupo funcionales.

Numerosos investigadores han demostrado que el GO puede utilizarse como transportador de fármacos y otras biomoléculas, pudiendo usarse en combinación con otros materiales o con factores de crecimiento en aplicaciones médicas, jugando un papel facilitador para otros materiales usados en sistemas de liberación de fármacos.

El óxido de grafeno posee ventajas como un alto módulo elástico, excelente flexibilidad y bajo coste comparado con otros materiales carbonosos, y es por ello por lo que se considera un refuerzo efectivo para dispositivos híbridos con aplicaciones en biomedicina. Además, al tener el GO un alto número de grupos hidrofílicos en su superficie, es estable ante solventes polares, creando una dispersión uniforme por medio de repulsiones electrostáticas y fuertes interacciones entre los grupos funcionales oxigenados de las nanoláminas de GO y la matriz polimérica. [29]

2.3.3 Dispositivos híbridos de PCL/GO

Hace tan solo unos meses, Nematpour et al. [30] realizaron un estudio sobre la liberación de un antibiótico, la tetraciclina, a través de un parche transdermal formado por dextrano (un polisacárido altamente hidrofílico) y policaprolactona, con refuerzo de óxido de grafeno.

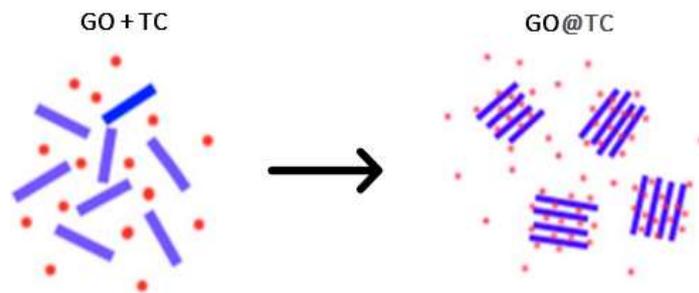


Figura 13. Representación esquemática de la incorporación de tetraciclina en el óxido de grafeno, Nematpour et al. [30]

El fármaco se incorporó al GO mediante sonicación y el complejo óxido de grafeno-tetraciclina, "GO@TC", se incorporó a una estructura de nanofibras de dextrano. A su vez, la nanoestructura de dextrano se acopló a una capa de fibras de policaprolactona con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas de la estructura y proteger el parche del agua.

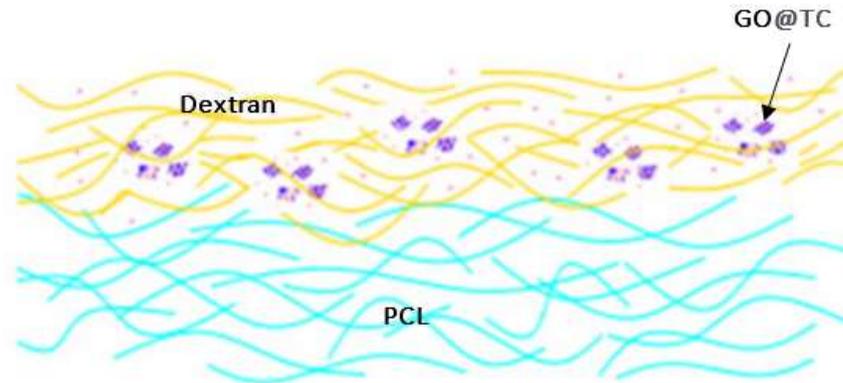


Figura 14. Representación esquemática del parche transdermal fabricado por Nematpour et al. [30]

Para estudiar la influencia del GO en la retención y liberación del fármaco, Nematpour et al. prepararon otro dispositivo transdermal sin GO, donde el fármaco se incorporó directamente en las fibras de dextrano, sobre la capa de policaprolactona. Las muestras se introdujeron en 100 mL de solución tamponada de fosfato (PBS) y se midió la cantidad de fármaco liberado mediante espectroscopía UV-VIS. Como resultado, se obtuvieron los perfiles de liberación mostrados en la Figura 15. Como se puede observar, en el parche sin GO (Figura 15a), la liberación de la tetraciclina es tan rápida que en 24 horas ya se ha alcanzado el 90% de liberación. En cambio, en el parche donde la tetraciclina ha sido

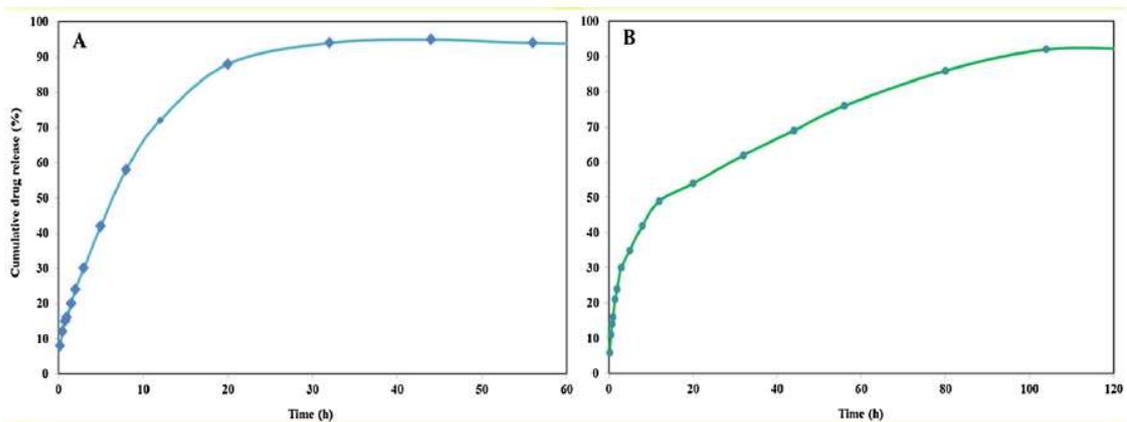


Figura 15. Perfiles de liberación del dispositivo transdermal (a) sin GO y (b) con GO, por Nematpour et al. [30]

incorporada en el GO (Figura 15b), la liberación del fármaco es mucho más progresiva, debido a que la TC se encuentra retenida en la red de GO.

Además del estudio de liberación, se realizó un estudio in vitro con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli* para determinar si la tetraciclina impedía que se desarrollara infección y se confirmó que el dispositivo transdermal impedía el crecimiento de las bacterias. De este modo, los resultados de este estudio indicaron que el híbrido Dextrano/PCL/GO es un dispositivo eficiente en la administración de TC para tratar heridas infectadas.

Otro proyecto realizado por Weng et al. [31] estudió los dispositivos de óxido de grafeno funcionalizado con policaprolactona para aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. El fármaco que se empleó para estudiar el perfil de liberación desde el dispositivo fueron cápsulas de lomefloxacina (LMF). En primer lugar, se sintetizaron los híbridos de GO/PCL con distintas concentraciones de GO mediante esterificación de Steglich (reacción de esterificación con diciclohexilcarbodiimida como agente acoplante y 4-dimetilaminopiridina como catalizador). La incorporación de LMF se realizó mediante disolución del fármaco con PLA en tetrahidrofurano (THF) y evaporación del disolvente a 90°C. Las muestras secas se introdujeron entonces en una prensa de platos calientes y se obtuvieron como resultado los composites de GO/PCL/LMF.

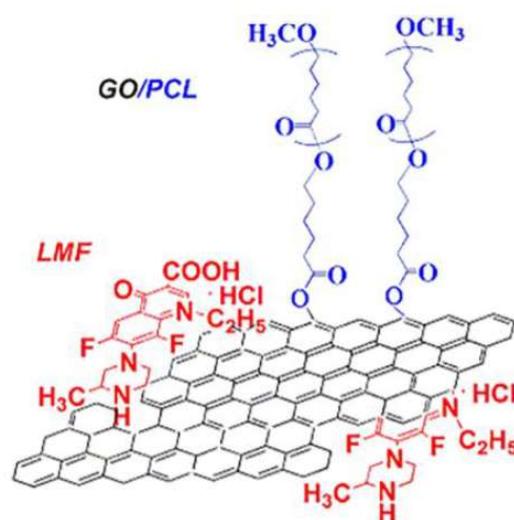


Figura 16. Representación esquemática del LMF incorporado en el híbrido de GO/PCL, Weng et al. [31]

El ensayo de liberación se llevó a cabo en PBS 0.1M, a pH 7.4 y se caracterizó mediante espectroscopía UV-VIS. Este estudio demostró que los dispositivos híbridos de GO/PCL eran capaces de liberar el fármaco a velocidad constante y controlada, a diferencia de las muestras de PCL pura. También se observó que cuanto mayor era el porcentaje de óxido de grafeno, más rápida era la liberación del fármaco, encontrándose el punto óptimo en 4% GO/PCL (Figura 17). La razón por la que el óxido de grafeno disminuye el tiempo de liberación de estos dispositivos con matriz de policaprolactona, según Weng et al., reside en la gran cantidad de grupos funcionales con oxígeno del GO. Estos grupos oxigenados aumentan la hidrofiliidad de la PCL, por lo que la liberación del fármaco se ve favorecida.

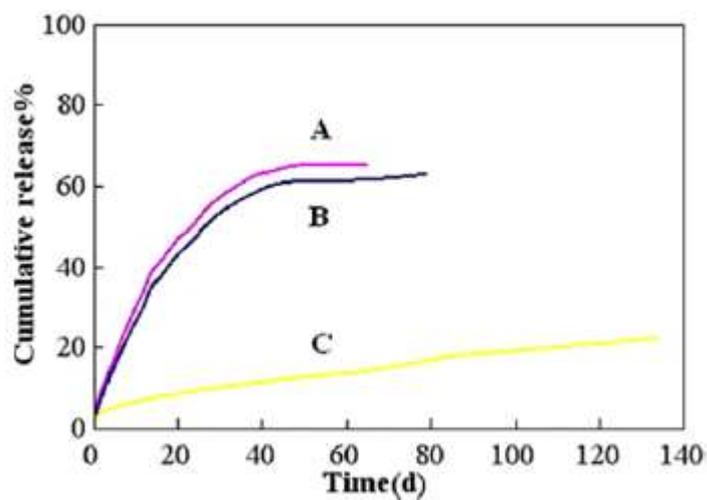


Figura 17. Perfiles de liberación con muestras (a) PLA-4% wt GO/PCL, (b) PLA-3% wt GO/PCL, (c) PLA-PCL, por Weng et al. [31]

La conclusión que se extrae de este artículo es que el perfil de liberación in vitro obtenido indica que los dispositivos con matriz GO/PCL son eficientes si lo que se busca es acortar el tiempo de liberación del fármaco.

2.3.4 Incorporación de fármacos al GO

Las formas de incorporación de fármacos en soportes de óxido de grafeno que se conocen hasta la fecha son cuatro:

a) *Enlaces covalentes*

Una manera de incorporar moléculas en la estructura del GO es a través de enlaces covalentes. Existe la opción de enlazar el fármaco covalentemente al soporte de GO, pero para esto la molécula debe presentar los grupos funcionales adecuados. Por tanto, también se ha puesto en práctica la opción de enlazar un polímero al GO e incorporar el fármaco en el polímero.

Wojtoniszak et al. [32] realizaron un estudio en el que enlazaron el fármaco anticancerígeno metotrexato a un soporte de óxido de grafeno mediante enlaces de amidas. Por otro lado, Sun et al. [33] estudiaron las uniones covalentes y no-covalentes entre el polietilenglicol (PEG) y el óxido de grafeno para la liberación de fármacos anticancerígenos y descubrieron que las nano láminas de grafeno funcionalizadas con PEG eran biocompatibles, sin toxicidad aparente y podían servir de soporte para la incorporación de fármacos aromáticos anticancerígenos con alta eficiencia.

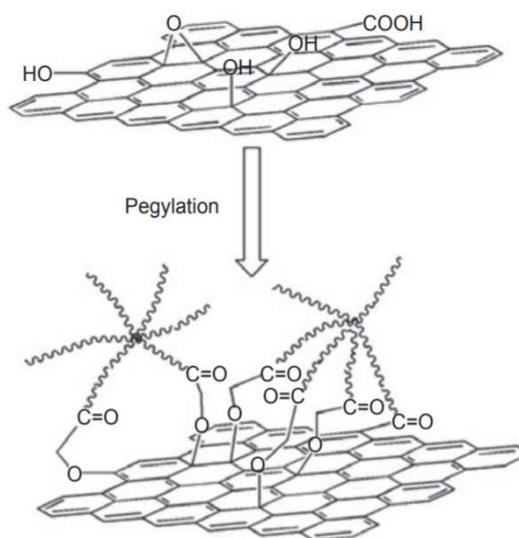


Figura 18. Representación esquemática de la funcionalización de una lámina de óxido de grafeno con Polietilenglicol. [33]

b) *Enlaces de hidrógeno*

El óxido de grafeno puede unirse a las moléculas de fármaco mediante sus grupos hidroxilo (-OH) y carbonilo (-COOH) a grupos funcionales con átomos electronegativos, aunque este tipo de enlace suele encontrarse acompañado de interacciones $\pi - \pi$. [34]

c) *Fisisorción por interacciones $\pi - \pi$*

Las interacciones $\pi - \pi$ consisten en enlaces no covalentes entre compuestos orgánicos que contienen entidades aromáticas.

Yang et al. ^[35] llevaron a cabo un experimento en el que incorporaron doxorubicina en óxido de grafeno mediante sonicación y centrifugación. Para medir la cantidad de fármaco incorporado en la superficie del óxido de grafeno emplearon espectroscopía ultravioleta-visible y llegaron a la conclusión de que la estructura del GO podía formar interacciones $\pi - \pi$ con los grupos quinona de la doxorubicina. También observaron la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (-OH) y carbonilo (-COOH) de las láminas de grafeno con los grupos hidroxilo y amino (-NH₂) de la doxorubicina. De esta forma se pudo incorporar el fármaco al GO sin formación de enlaces covalentes, simplemente mezclando ambas sustancias en una disolución acuosa mediante sonicación.

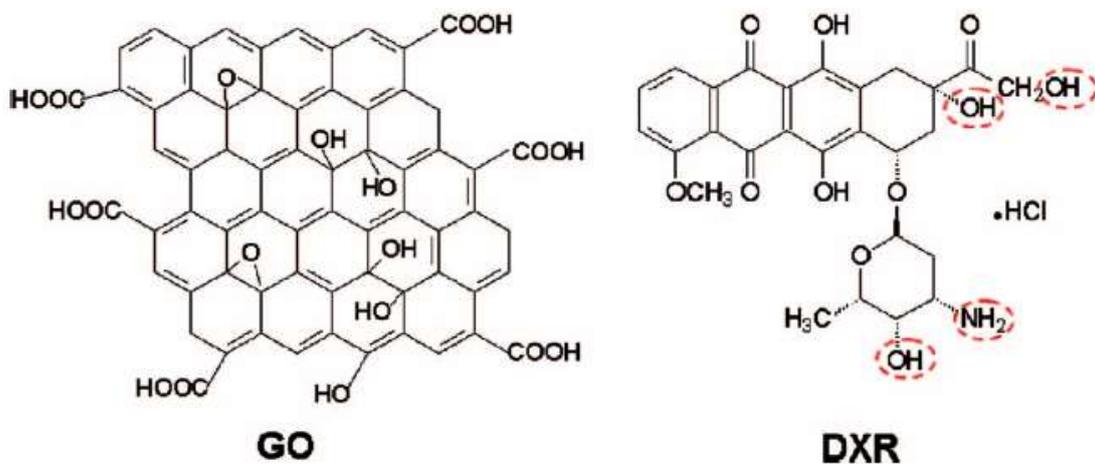


Figura 19. Estructura química del óxido de grafeno (GO) y la doxorubicina (DXR) ^[35]

d) *Enlaces disulfuro*

Otra forma de unir moléculas a las láminas de óxido de grafeno es mediante la formación de enlaces disulfuro. Yang et al. ^[36] sintetizaron unos nanohíbridos de óxido de grafeno y poli-2-dimetilamino-etilmetacrilato (PDMAEMA). Las moléculas de PDMAEMA se unieron

al óxido de grafeno mediante enlaces disulfuro obteniendo una estructura híbrida GO-SS-PDMAEMA a la que se pueden incorporar fármacos mediante adsorción.

2.4. Mecanismos de degradación en dispositivos poliméricos de liberación de fármacos

Existen dos mecanismos de degradación en dispositivos poliméricos aplicados a la liberación de fármacos: degradación superficial y degradación volumétrica.

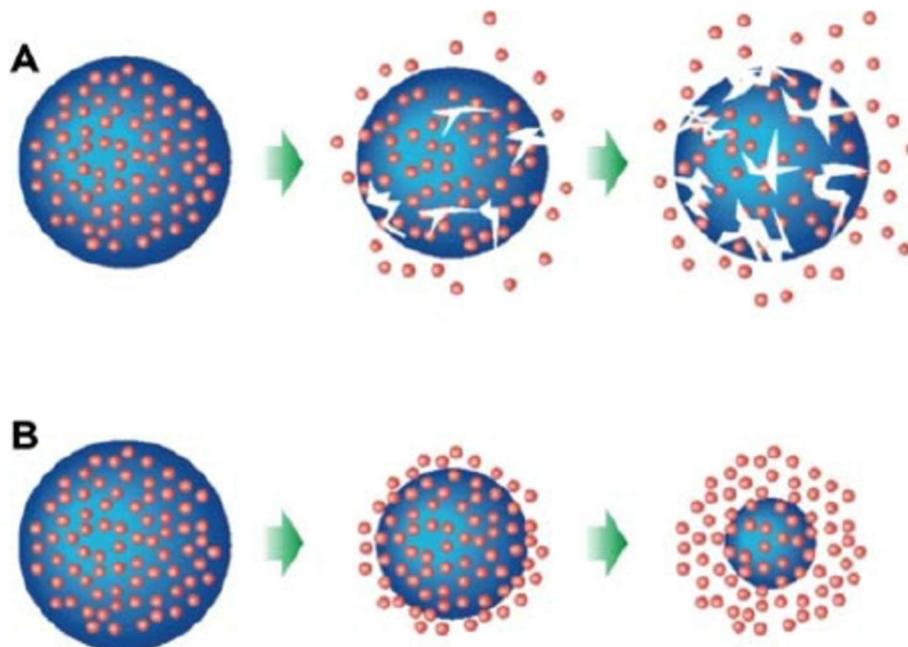


Figura 20. Representación esquemática de los mecanismos de degradación volumétrica (A) y degradación superficial (B) [37]

La **degradación volumétrica**, en cambio, ocurre cuando la velocidad de difusión del agua en el polímero es superior a la velocidad de rotura de los enlaces poliméricos. El agua del medio es capaz de penetrar en la matriz polimérica, dando lugar a la hidrólisis aleatoria de fragmentos de la cadena polimérica a lo largo de la matriz, de una manera más o menos uniforme [38].

En este tipo de degradación, el peso molecular y las propiedades mecánicas del polímero disminuyen con el tiempo. La disminución del peso molecular ocurre desde el principio del

proceso de degradación, mientras que la pérdida de masa comienza con más retraso (Figura 21). Las dimensiones externas del dispositivo permanecerán prácticamente idénticas, hasta que el material se desintegre cuando se alcance un punto crítico ^[39].

Los polímeros con este tipo de degradación, empleados en dispositivos de liberación de fármacos, suelen presentar una velocidad de liberación de fármaco excesivamente alta en la última fase de la degradación, a causa de la degradación abrupta en la matriz polimérica.^[40]

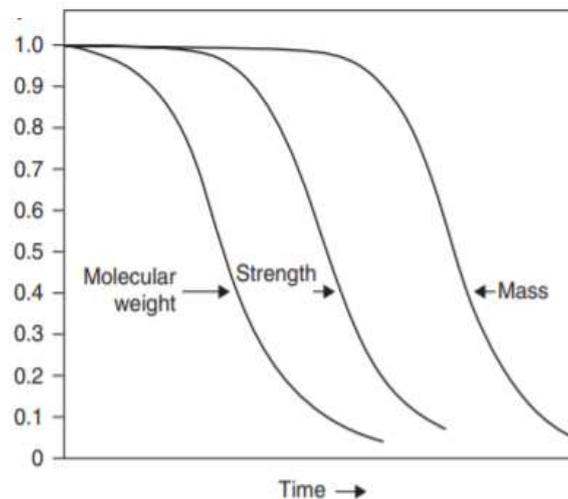


Figura 21. Representación gráfica de la degradación volumétrica ^[39]

La **degradación superficial o erosión** tiene lugar cuando la rotura de los enlaces la cadena polimérica es únicamente superficial. Esto ocurre cuando la velocidad de la escisión de cadena por hidrólisis y la producción de oligómeros y monómeros es mayor que la velocidad de la difusión del agua en el polímero ^[39].

El resultado es que la pérdida de material ocurre únicamente en la superficie del dispositivo. El tamaño y la masa del material decrecen linealmente en el tiempo, mientras que el peso molecular y las propiedades mecánicas del dispositivo polimérico no degradado se mantienen prácticamente inalterados (Figura 22).

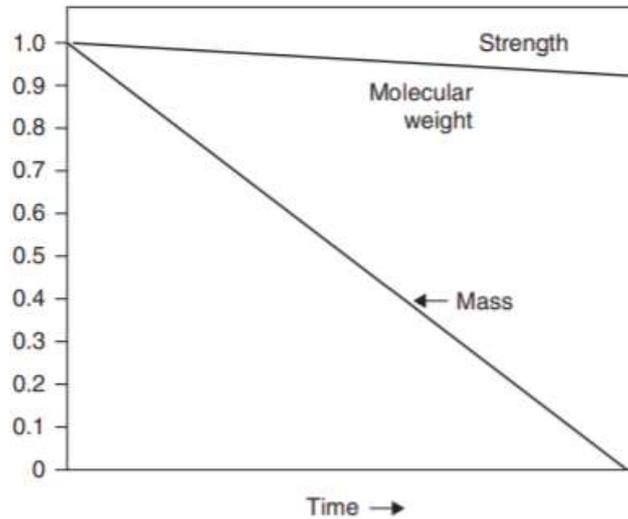


Figura 22. . Representación gráfica de la degradación superficial^[39]

Un polímero que experimenta una degradación por erosión superficial es capaz de proporcionar una velocidad de liberación de fármaco constante y controlada. Algunos polímeros que degradan de esta forma son los polianhídridos y los polioctoésteres.^[37]

El diseño y la fabricación de films delgados basados en polímeros biodegradables como la PCL está siendo el centro de atención de una parte de la investigación biomédica actual, en especial para aplicaciones de matrices poliméricas en ingeniería tisular y liberación de fármacos.

La degradación hidrolítica de la PCL puede suceder por erosión superficial o por degradación volumétrica. Esto depende de la velocidad relativa entre los fenómenos de difusión del agua y reacción hidrolítica, que vienen condicionados por las propiedades superficiales del dispositivo, como la porosidad. De este modo, los *scaffolds* de PCL con una alta porosidad y una buena interconexión de los poros se degradarían preferentemente por la vía volumétrica, mientras que los dispositivos más compactos favorecerían una degradación superficial^[41]. Además de las propiedades superficiales del material, existen

otros factores capaces de afectar al mecanismo de degradación hidrolítica. En general, cualquier acción que favorezca la penetración de agua (como, por ejemplo, mezclar con un polímero hidrofílico) en el material acelerará la velocidad de degradación hidrolítica. Dos factores importantes que afectan la velocidad de degradación son la temperatura de transición vítrea del polímero (T_g) y la cristalinidad, ya que condicionan la capacidad del agua de penetrar en el material. Una alta T_g implica poco espacio libre en la red polimérica y baja movilidad molecular, por lo que hay poco espacio disponible para que difundan las moléculas de agua. De igual modo, un alto grado de cristalinidad limita la penetración de agua a través de las cadenas poliméricas compactas. En cambio, cualquier acción que reduzca la T_g y la cristalinidad facilitará y acelerará la degradación hidrolítica. Una manera de evitar la cristalinidad del material y aumentar la velocidad de degradación es la fabricación de redes poliméricas de PCL, en vez de PCL lineal. ^[42]

Una forma de llevar a cabo la degradación acelerada de la PCL es mediante el uso de enzimas tipo lipasa. Existen tres tipos de lipasas que han demostrado acelerar significativamente la degradación de PCL: *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus* y *Pseudomonas*. Gan et al. ^[43] consiguieron llevar a cabo la degradación completa de muestras de PCL cristalina en tan solo 4 días en una disolución de PBS con lipasas tipo *Pseudomonas*; en cambio, una degradación hidrolítica podría durar varios años. Martínez-Ramon et al. ^[44] emplearon la misma enzima en un estudio de degradación de composites de PCL/GO con distintas concentraciones de GO. Pudieron observar gracias a un ensayo de pérdida de masa que, cuanto mayor era el contenido en GO del material híbrido, más lento era el proceso de degradación. Este comportamiento se atribuyó a la dificultad de las enzimas por alcanzar la matriz polimérica a causa de las propiedades barrera del GO, que hacen que el camino de difusión se vuelva más tortuoso. Además, al estar una porción de la superficie de las muestras híbridas ocupada por el GO, queda menos superficie disponible para ser atacada por las enzimas, lo cual ralentiza la degradación por erosión superficial.

Otra manera de acelerar la degradación de la PCL sería empleando un medio de degradación altamente ácido o básico. Los valores extremos de pH actúan favoreciendo la hidrólisis del poliéster sin modificar la estructura o las propiedades intrínsecas del polímero. Otros métodos como la degradación térmica imitan peor las condiciones fisiológicas, ya que la elevación de la temperatura tiene un efecto drástico en la estructura morfológica

(cristalinidad) y en la composición de los dispositivos PCL debido a su bajo punto de fusión (60°C), por lo que no es apropiado llevar a cabo la degradación de PCL a temperaturas elevadas. ^[45]

En el presente trabajo se estudiará cómo afecta el proceso de degradación hidrolítica acelerada de los híbridos de PCL/GO al perfil de liberación de doxorubicina. Para ello, siguiendo trabajos previos, se realizará el ensayo a pH 13. Los tiempos de degradación no pueden ser muy cortos, ya que esto podría provocar una liberación de fármaco tan grande que provoque toxicidad, pero el tiempo de degradación tampoco puede ser demasiado lento, ya que, si no se supera el umbral de concentración mínima, el fármaco no será efectivo.

2.5. Análisis de dispositivos polímero/GO para liberación de fármacos

Como se ha explicado anteriormente, la incorporación de óxido de grafeno a los dispositivos poliméricos mejora las propiedades mecánicas, la hidrofiliidad, la versatilidad para el anclaje de biomoléculas y favorece las propiedades antibacterianas. Como resultado de la gran cantidad de grupos funcionales oxigenados que se encuentran en la superficie del óxido de grafeno, las nanoláminas de GO exhiben una alta solubilidad en el agua, lo cual hace que sea un buen candidato para aplicaciones biomédicas, concretamente para liberación controlada de fármacos.

En 2017, Rasoulzadeh et al.^[46] desarrollaron unas esferas de hidrogel híbrido biodegradable formado por carboximetilcelulosa/óxido de grafeno (CMC/GO) para un sistema de liberación de fármacos. El dispositivo híbrido se entrecruzó físicamente con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para lograr una liberación controlada de doxorubicina.

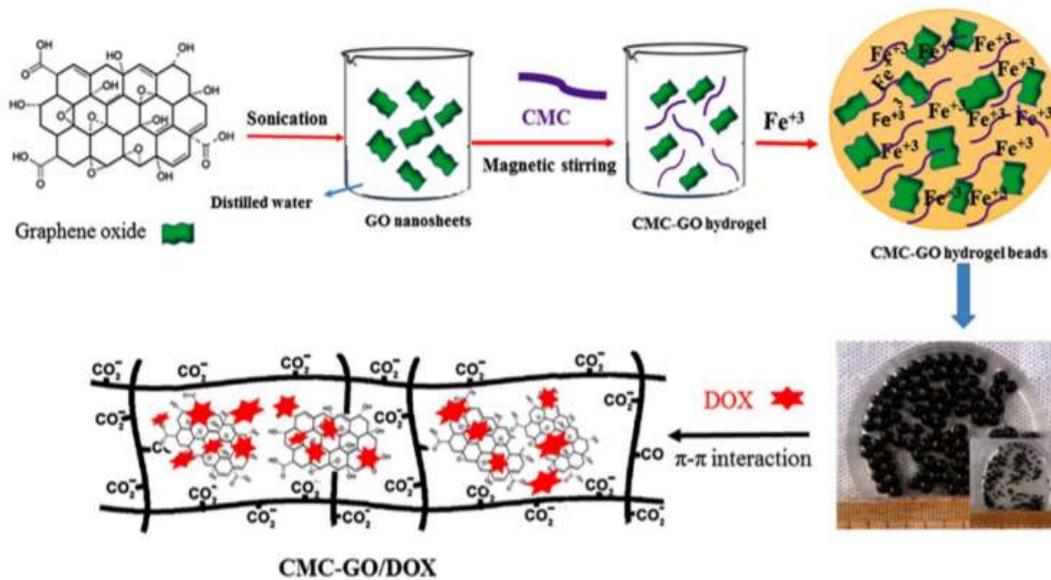


Figura 23. Proceso esquematizado de síntesis de los dispositivos carboximetilcelulosa/óxido de grafeno por Rasoulzadeh et al.^[46]

Las interacciones π - π entre el fármaco y el GO resultaron en una elevada capacidad de carga y una liberación controlada del fármaco cargado en los vehículos de nanocomposite CMC/GO. Los investigadores se percataron de que la interacción entre el óxido de grafeno

y la doxorrubicina mediante enlaces de hidrógeno se vuelve inestable en medio ácido (pH=6.8), lo cual resultaba en una liberación más rápida del fármaco.

La capacidad de hinchamiento de los hidrogeles de nanocomposite se investigó en soluciones PBS a distintos valores de acidez (pH 1.2, 6.8 y 7.4). Los resultados que obtuvieron mostraban que la razón de hinchamiento de los hidrogeles de nanocomposite, aumentaba con la incorporación de nanopartículas de óxido de grafeno debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre las láminas de GO, las moléculas de agua y los grupos carboxilo de los hidrogeles de CMC. El hinchamiento en las distintas soluciones tampón mostró diferencias significativas, lo cual significa que el hidrogel es sensible al pH.

De esta forma, este estudio demostró que el hidrogel de nanocomposite tenía mayor capacidad de carga que el hidrogel puro, así como un mayor control en la retención/liberación del fármaco. La liberación del fármaco cuando se empleaba un dispositivo híbrido CMC/GO era más controlada que cuando se empleaba el hidrogel puro, ya que al aumentar la cantidad de nanopartículas de GO, la liberación de doxorrubicina se veía reducida debido a las fuertes interacciones entre los grupos amina del fármaco y los grupos carboxilo del GO.

Por otro lado, Wang et al. ^[47] idearon un dispositivo híbrido de nanopartículas poliméricas (PNPs) funcionalizadas con nano-láminas de óxido de grafeno para aplicaciones en liberación de fármacos, concretamente, la adriamicina (ADR) (nombre comercial de la doxorubicina).

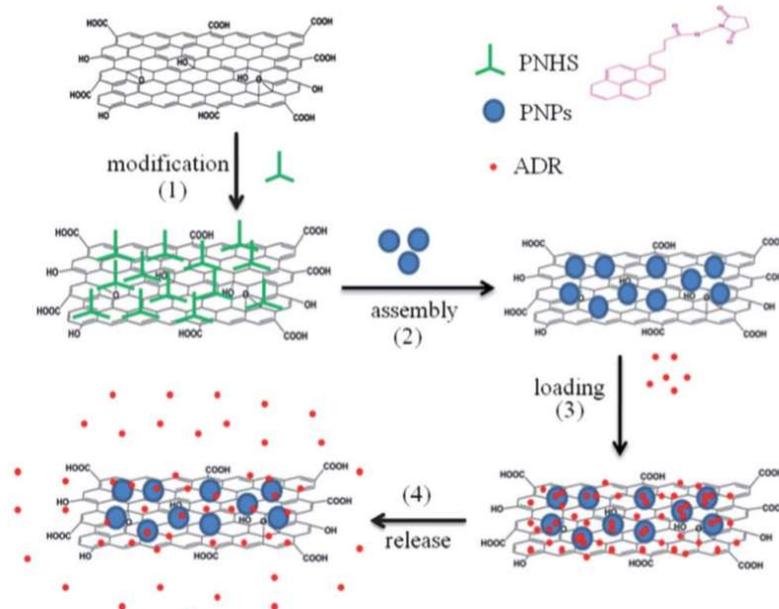


Figura 24. Representación esquemática de la síntesis de híbridos GO-PNP con incorporación y liberación de moléculas de fármaco, por Wang et al. ^[47]

En primer lugar, sintetizaron nanopartículas poliméricas termo-sensitivas con un diámetro medio de 50 nm con radicales libres para la reacción de polimerización, así como nano-láminas de GO que se modificaron con un agente entrecruzador bifuncional, el ácido 1-pirenbutírico N-hidroxisuccinimida (PNHS), para crear sitios de reacción a los que pudieran unirse las PNPs. De esta manera, los híbridos PNP/GO se sintetizaron gracias a la interacción covalente entre las PNPs y las nano-láminas de GO.

Estos investigadores emplearon técnicas de caracterización para identificar la formación de las PNPs, la modificación de las nano-láminas de GO y la formación de los híbridos de PNP/GO mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los cultivos celulares con osteoblastos de ratón indicaron que se formaron híbridos de PNP/GO con una biocompatibilidad satisfactoria.

La eficiencia de carga de las moléculas de doxorubicina empleando los *scaffolds* de PNP/GO (87%) era cercana a la del GO (91%) pero significativamente más alta que la de las PNP (46%). Por otro lado, la eficiencia de liberación del fármaco con los *scaffolds* híbridos con la mayor cobertura de PNP (unas 87 PNP por μm^2) era de 22%, lo cual está muy cerca de la eficiencia de las PNP (25%) pero es significativamente mayor que la del GO (11%).

Este estudio indicó que los híbridos termosensitivos de PNP/GO tienen un mejor desempeño que las PNP y el GO por separado, y por tanto puede ser usado como un “nanovehículo” novedoso para la liberación de fármacos controlada por la temperatura, puesto que los resultados mostraron que los híbridos con el fármaco eran capaces de matar células cancerígenas *in vitro* más eficientemente que los vehículos de PNP y GO. Se espera que este nuevo material híbrido basado en nanopartículas poliméricas y óxido de grafeno tenga un gran potencial para aplicaciones de quimioterapia *in vivo*.

Justin et al. ^[48] estudiaron en 2014 los efectos del óxido de grafeno en el perfil de liberación de fármacos cargados en dispositivos con base de quitosano. Se estudiaron sus propiedades mecánicas y su velocidad de biodegradación, con el objetivo de alcanzar una composición óptima de los nanocomposites quitosano/GO para aplicaciones en dispositivos de liberación de fármacos, como por ejemplo, en matrices de microagujas para la administración transdermal de medicamentos.

El modelo de fármaco que seleccionaron para este estudio fue la fluoresceína sódica (FL), por su similitud en tamaño a muchos fármacos importantes como el cisplatino usado en el tratamiento del cáncer, el fármaco antiinflamatorio indometacina, o el vasodilatador timolol maleato.

Los investigadores prepararon nanocomposites de quitosano con contenidos del 0.25, 0.5, 1, 2, y 5% en masa de GO, así como una matriz de quitosano puro sin GO. Se realizó entonces un estudio comparativo en el que el vehículo de quitosano puro se cargó con la misma cantidad de fármaco que los vehículos nanohíbridos (45.6% en peso de FL) y se observó que los híbridos liberaban un 72% más de fármaco y alcanzaban la liberación máxima en un periodo de tiempo más corto que las muestras de quitosano puro.

Por otro lado, se obtuvieron diferentes perfiles de liberación del fármaco durante los ensayos en medio neutro y medio ácido y se observó una reducción en la liberación del FL en medio ácido, revelando una liberación del fármaco sensitiva al pH. Los nanocomposites de quitosano/GO se degradaron más lentamente que la muestra de quitosano puro, a causa de los fuertes enlaces entre el GO y el quitosano. Esto demuestra, una vez más, la utilidad del óxido de grafeno como soporte en dispositivos de liberación controlada de fármacos.

En 2018, Mao et al. ^[49] prepararon unas membranas de nanofibras de ácido poliláctico (PLA)/óxido de grafeno (GO) con diferentes estructuras (estructura monoaxial y coaxial) mediante electrohilado. En este estudio, se caracterizaron y compararon las morfologías, estructuras y propiedades mecánicas de las membranas de nanofibras preparadas, y se evaluó el rendimiento de liberación del fármaco de las membranas de nanofibras utilizando un colorante orgánico (Rhodamine B, RhB) como modelo de fármaco.

Los resultados de este estudio mostraron que la adición de GO no solo mejoró significativamente la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas de las membranas de nanofibras de PLA, sino que también estimuló la liberación total y la velocidad de liberación de RhB.

Kazempour et al. ^[50] sintetizaron en 2019 unos “nanovehículos” basados en óxido de grafeno, sensibles al pH y a la temperatura para aplicaciones en la liberación de fármacos contra el cáncer. La superficie del óxido de grafeno (GO) se funcionalizó con compuestos poliméricos biodegradables e hidrófilos, poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) y ácido poliglicólico (PGA) para llevar a cabo la carga y liberación efectiva del fármaco quimioterapéutico oxaliplatino. Primero se obtuvo el complejo GO-PNVCL por polimerización del NVCL y esta estructura se sumergió en tetrahidrofurano anhidro, añadiendo gradualmente diisopropilamida de litio. Tras esto, se añadió el ácido glicólico gota a gota, obteniendo finalmente GO-PNVCL-PGA. (Figura 25)

El oxaliplatino se cargó en la superficie de óxido de grafeno del composite GO-PNVCL-PGA gracias a las interacciones π - π . El perfil de liberación de oxaliplatino desde los dispositivos de GO-PNVCL-PGA se tomó a dos pH diferentes (5.4 y 7.4) y a dos temperaturas distintas (27 y 45 ° C).

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

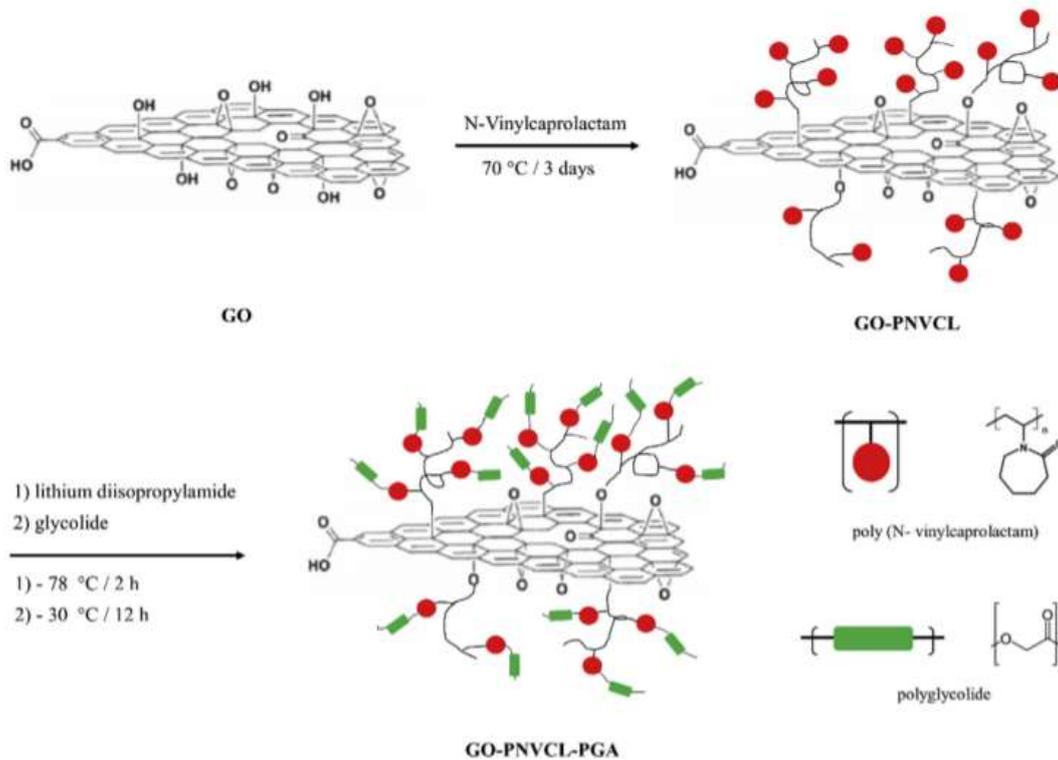


Figura 25. Ruta y condiciones de reacción para la síntesis de GO-PNVCL-PGA por Kazempour et al. [50]

El análisis DSC confirmó que la modificación de PNVCL con ácido poliglicólico provocó un cambio en el rango de temperaturas de transición, de 32°C - 34°C a 36°C - 37 °C (que es el rango de temperatura corporal normal). Por otro lado, los efectos de citotoxicidad del oxaliplatino, del composite GO-PNVCL-PGA y del composite cargado de oxaliplatino en células de cáncer de mama humano (MCF-7), se estimaron mediante un ensayo colorimétrico. Los resultados indicaron que la citotoxicidad del GO-PNVCL-PGA con oxaliplatino en las células cancerosas fue mayor que la del oxaliplatino libre, lo que significa que el GO-PNVCL-PGA cargado con oxaliplatino se puede aplicar como un composite prometedor para la utilización en sistemas de liberación de fármacos contra el cáncer. Este estudio vuelve a demostrar la capacidad del GO para liberar de forma eficiente un fármaco quimioterapéutico en los tejidos tumorales.

En otro estudio llevado a cabo por Fan et. al [51], se fabricó un dispositivo para liberación controlada de fármacos formado por alginato de sodio (SA) con óxido de grafeno. El GO fue previamente funcionalizado con ácido adípico dihidrazida para introducir grupos amina y el

alginate de sodio se conjugó covalentemente con el GO a través de enlaces amida. El dispositivo híbrido resultante de GO-SA se usó como vehículo para encapsular doxorubicina y estudiar su perfil de liberación. La doxorubicina se incorporó en la superficie del material híbrido GO-SA mediante sonicación, a través de la formación de interacciones $\pi - \pi$ entre el GO y el fármaco.

Los investigadores estudiaron la velocidad de liberación de la doxorubicina en PBS a 37°C y a diferentes valores de pH: 7.4, 6.5 y 5, y mediante espectrometría UV-VIS obtuvieron los perfiles de liberación para cada pH (Figura 26).

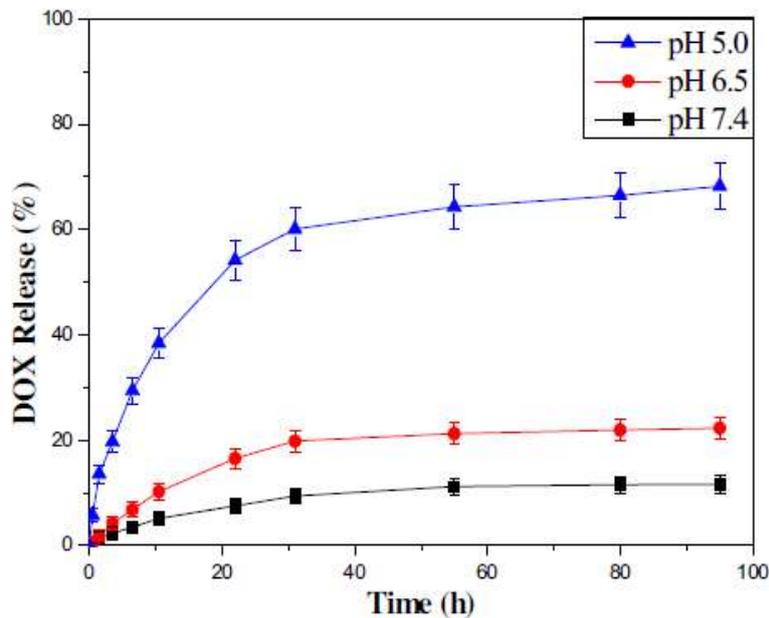


Figura 26 Perfiles de liberación de doxorubicina en dispositivos de GO-SA a pH 7.4, 6.5 y 5 por Fan et. Al [51]

Los resultados obtenidos por Fan et. al mostraron que la doxorubicina se liberaba muy lentamente en condiciones de pH neutro (pH=7.4) y la eficiencia en la liberación aumentaba conforme el pH disminuía. Se observó que en condiciones ácidas (pH=5) el fármaco se liberaba muy rápidamente al principio del ensayo, pero la velocidad de liberación disminuía gradualmente tras las 12 primeras horas.

Este estudio demuestra que la liberación de la doxorubicina es sensible al pH del medio y su velocidad y cantidad de liberación es mayor en condiciones ácidas.

2.6. Degradación de dispositivos basados en PCL a pH básico

El interés de estudiar la degradación de la policaprolactona en medio básico viene de estudios en los que se ha demostrado que la hidrólisis de este polímero es sensible al pH y la velocidad de degradación aumenta con la basicidad del medio. De esta manera, se podrían simular ensayos de degradación *in vitro* en unas cuantas semanas, que *in vivo* durarían años.

Htay, et al. [52] realizaron en 2004 un estudio de degradación hidrolítica acelerada de films de PCL en una disolución acuosa de NaOH 5M. Emplearon láminas de film de PCL, algunas de las cuales fueron perforadas con una aguja y un software customizado para ejecutar la perforación. Los films de PCL se sumergieron en matraces de 25 mL llenos de medio de degradación para asegurar que los films estuvieran completamente sumergidos, y estas muestras se incubaron a 37°C. Los films se extrajeron cada 4 horas para someterlos a caracterización, tras ser lavados repetidas veces con agua desionizada y secados a 40°C a vacío durante 24 horas.

Los resultados de este estudio mostraron que la pérdida de masa en los films intactos y en los perforados seguía un perfil de degradación muy similar (Figura 27). Ambos tipos de films siguieron una velocidad de degradación estable.

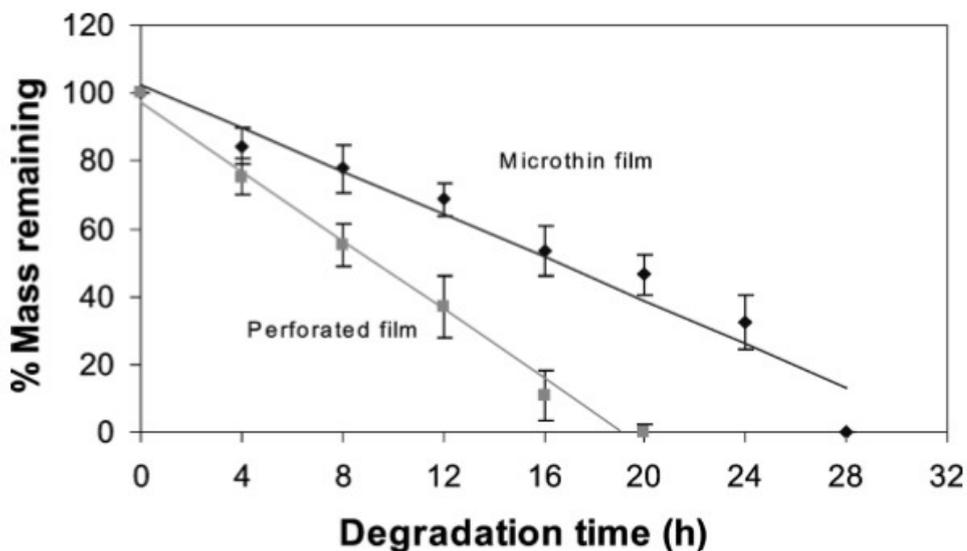


Figura 27. Ilustración gráfica de los perfiles de pérdida de masa de los microfilms intactos y perforados degradados en NaOH 5M por Htay, et al. [52]

Los microfilms intactos presentaron una pérdida de masa considerable desde el principio del experimento. Los microfilms sin perforar se disolvieron completamente tras unas 28 horas en el medio de degradación y los films perforados se disolvieron completamente antes de alcanzar las 20 horas. Para ambos tipos de film, se observó que, hacia el final de la degradación, antes de haberse disuelto completamente, las muestras se rompieron en grandes fragmentos. Esta fragmentación se observó a las 20 horas para las muestras intactas y a las 16 horas para las muestras perforadas. Durante estas últimas horas de degradación, los fragmentos recuperados para la caracterización eran más pequeños y en el último tiempo de extracción, los films eran blandos y delicados.

En la Figura 28, se observa que la velocidad de degradación para los films sin perforar era casi la mitad de la velocidad de los films perforados. Tras observaciones visuales y procesos de caracterización, los investigadores llegaron a la conclusión de que los films de PCL parecían haberse degradado principalmente por degradación superficial o erosión.

A partir de observación visual y caracterización, la pérdida de masa en función del tiempo de degradación fue descrita por Htay, et al. considerando que pasó por dos estados: el primero era la disminución inicial de pérdida de masa a una velocidad lenta y estable, y el segundo, una rápida pérdida de masa que conduce a la fragmentación de las muestras, seguida por la completa disolución de estas. Debido a este comportamiento, los investigadores hipotizaron que, inicialmente, la pérdida de masa de los films de PCL era debida a la degradación de las zonas amorfas. Una vez que la mayor parte de las zonas

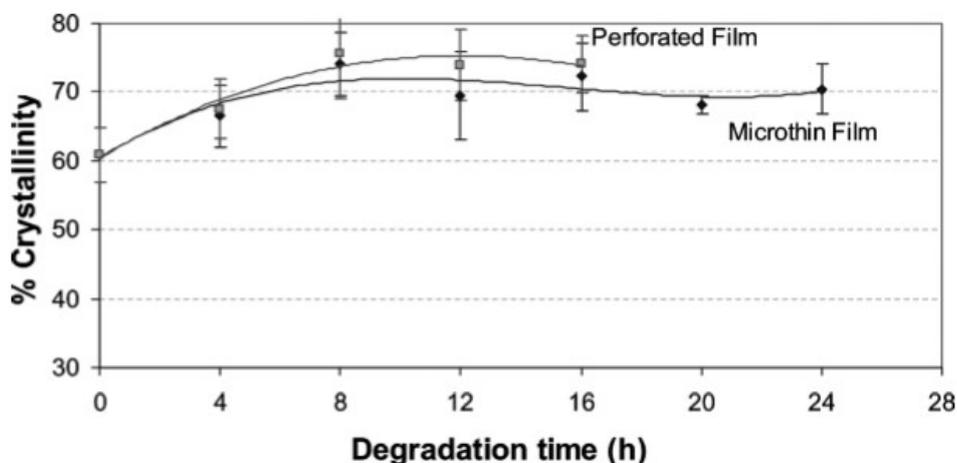


Figura 28. Ilustración gráfica de los cambios en la cristalinidad de los films de PCL degradados en NaOH 5M por Htay, et al. [52].

amorfos estuvo degradada, las zonas cristalinas empezaron a ser atacadas, dando lugar a la fragmentación de los films, que corresponde a la rápida pérdida de masa.

Como se puede ver en la Figura 28, se detectó un aumento inicial de la cristalinidad en ambos tipos de films, y tras 8 horas, la cristalinidad permaneció constante hasta las 20 horas para las muestras perforadas y hasta las 28 horas para las muestras sin perforar, momento en el que disolvieron completamente. El aumento de cristalinidad al principio puede ser indicativo de la degradación preferencial de las regiones amorfas de los films de PCL.

Por otro lado, Deliormanli et al. ^[53] llevaron a cabo un estudio en febrero de 2019 en el que sometían a degradación hidrolítica a pH básico unos *scaffolds* compuestos por PCL y grafeno (GPN). El estudio de degradación se llevó a cabo en *scaffolds* de PCL pura y en *scaffolds* con distintas concentraciones de grafeno: 1%GPN-PCL, 3% GPN-PCL, 5%GPN-PCL y 10%GPN-PCL. La degradación se realizó en una disolución acuosa de NaOH 5M bajo condiciones estáticas. Los *scaffolds* se mantuvieron en la disolución de NaOH a 37°C durante diferentes periodos de tiempo y cuando se sacaron de la disolución, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron a 25°C durante 7 días. Los investigadores también llevaron a cabo un experimento similar usando solución salina fosfatada (PBS) para realizar un estudio comparativo.

Deliormanli et al. detectaron un aumento significativo de la pérdida de masa en los *scaffolds* con mayor concentración de grafeno. Los resultados se muestran en las Figuras 29(a) y 29(b) para los *scaffolds* compuestos y los *scaffolds* de PCL pura, respectivamente. Como se puede observar, la pérdida de masa en las muestras de PCL pura fue de $21\% \pm 2.5$ tras una inmersión de 48 horas en NaOH. Sin embargo, bajo condiciones idénticas, la pérdida de peso para las muestras que contenían nanopartículas de grafeno fueron $27\% \pm 1.8$, $34\% \pm 2.3$, $46\% \pm 3.1$, para las muestras con contenidos en grafeno de 1%, 3%, 5% y 10% respectivamente. Los *scaffolds* de PCL pura se disolvieron completamente a los 14 días en la disolución de NaOH 5M. Los mismos experimentos llevados a cabo en la solución salina fosfatada presentaron una pérdida de peso despreciable o nula para todos los *scaffolds* y para los mismos intervalos de tiempo.

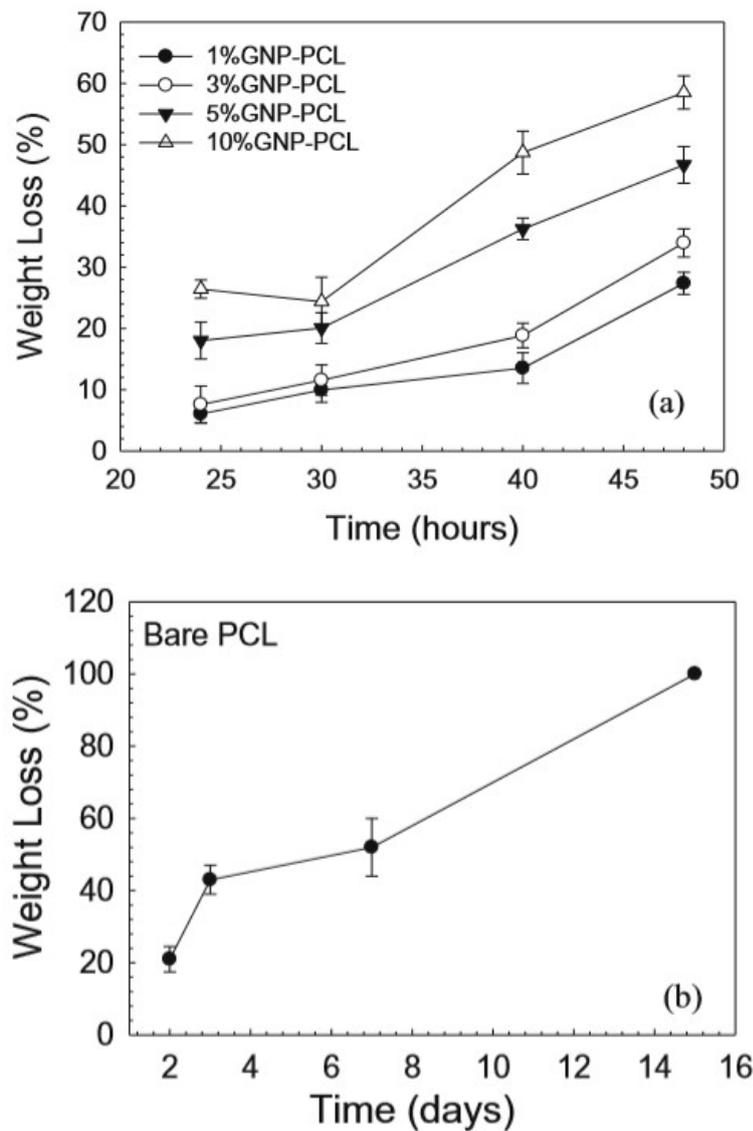


Figura 29. Gráficas de las velocidades de degradación de los scaffold de (a) PCL-GPN y (b) PCL pura, en una solución acuosa de NaOH 5M por Deliormanli et al. [53].

Se sabe que, en un proceso hidrolítico normal de la PCL, un ión carboxilato reacciona con un mol de agua para formar ácido carboxílico. Por otro lado, en presencia de NaOH acuoso, el ácido carboxílico reacciona con el ión Na^+ para dar una sal y agua. Según experimentos anteriores, para la degradación acelerada, el uso de NaOH es preferible que el uso de enzimas para muestras de PCL con alto peso molecular ($M_n > 5000$).^[54]

En el estudio de Deliormanli et al., a pesar de la naturaleza hidrofóbica de los nanoplatelets de grafeno, se percibió un aumento sustancial en la degradación hidrolítica de los *scaffolds* de grafeno y PCL en comparación con los *scaffolds* de PCL pura.

Otro experimento llevado a cabo por Sailema-Palate et al. [55] estudió la degradación de membranas de policaprolactona a valores de pH extremos. Los ensayos se llevaron a cabo a 37°C en una disolución de NaOH 2.5M a pH 13 y en una disolución de HCl 2.5M a pH 1. Las muestras degradadas a pH 13 mostraron una mayor velocidad de degradación que las muestras degradadas a pH 1. Como se puede observar en la Figura 30, a pH 13 se distinguen dos velocidades distintas en cuanto a la pérdida de masa. De 0 a 600 horas, se aprecia un perfil de degradación más o menos lineal y después la velocidad del proceso de degradación se ve reducida. Estas muestras alcanzaron una pérdida de masa del 98% a las 2110 horas. Por otro lado, las muestras degradadas a pH 1 presentaron un periodo de inducción de unas 300 horas, momento a partir del cual se observó una pérdida de masa continua hasta alcanzar un 97% tras las 2300 horas.

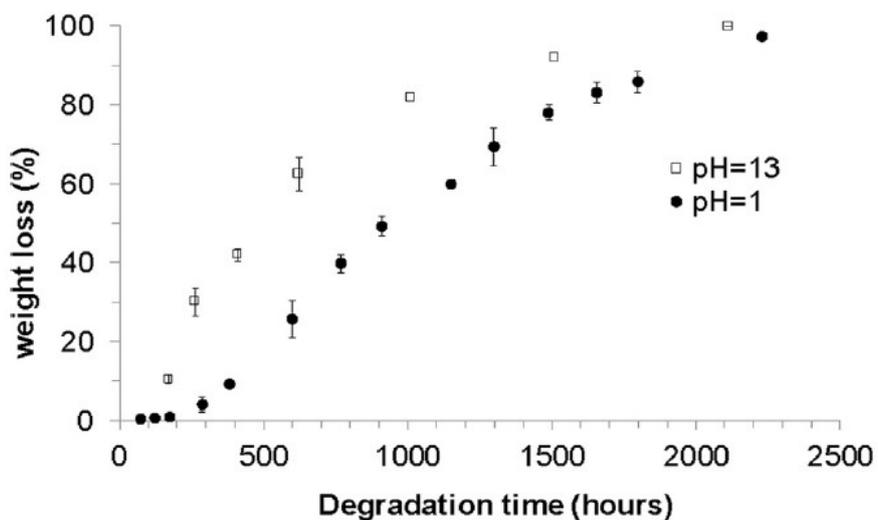


Figura 30. Perfil de pérdida de peso en función del tiempo, Sailema-Palate et al. [55]

Este comportamiento sugiere que la degradación a pH 13 tuvo lugar por erosión superficial y la degradación a pH 1 sucedió por vía volumétrica. Sailema-Palate et al. respaldaron esta teoría con otras técnicas de caracterización: no se observaron cambios significativos de peso molecular en las muestras degradadas a pH 13, en cambio, sí se obtuvo una

disminución de peso molecular en las muestras degradadas a pH 1. De igual modo, no se observaron cambios en las propiedades térmicas de los materiales degradados en medio básico, pero sí se observó un aumento de la cristalinidad y una disminución en la temperatura de fusión en las muestras degradadas en medio ácido.

Campillo-Fernández et al. [56] publicaron hace tan solo unos meses un artículo sobre el efecto de la concentración de GO en la degradación hidrolítica de dispositivos híbridos de PCL/GO a valores de pH extremos. Las muestras que se prepararon contenían concentraciones de GO de 0.1, 0.2 y 0.5% en masa y se degradaron en disoluciones de HCL 2.5M (pH 1) y de NaOH 2.5M (pH 13).

Se puede observar en la Figura 31a que, a pH 13, la pérdida de masa aumenta con el porcentaje de GO hasta las 625 horas. A tiempos de degradación más largos, el porcentaje de pérdida de masa fue similar para los composites PCL/GO-0.1 y PCL/GO-0.2 y para la PCL pura. Para el híbrido de PCL/GO-0.5, las muestras se degradaron muy rápidamente y la degradación se completó antes de las 72 horas.

En cambio, las muestras degradadas a pH 1 apenas experimentaron pérdida de masa, como se puede observar en la Figura 31b. La pérdida de masa es inferior al 2% a lo largo de todo el proceso de degradación, lo cual indica que la pérdida de masa era extremadamente lenta.

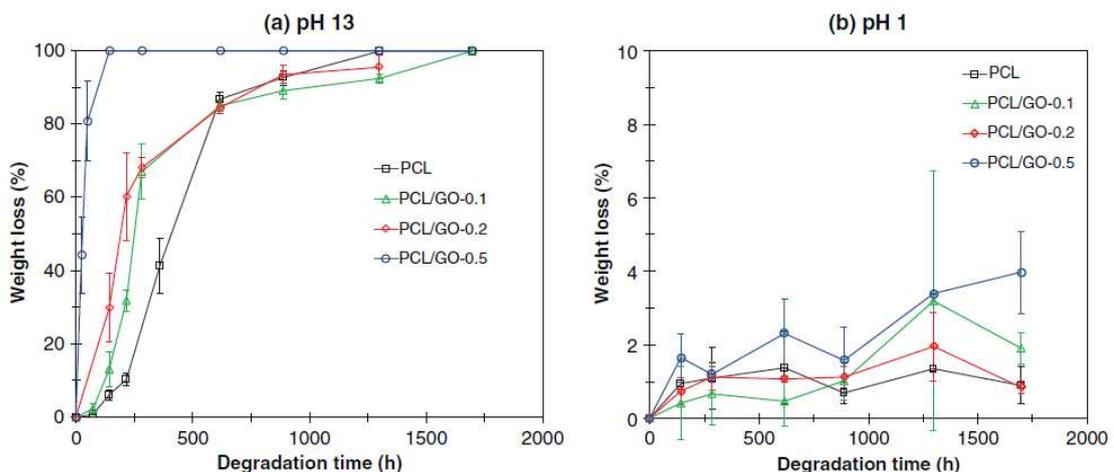


Figura 31. Perfiles de pérdida de masa en función del tiempo de degradación en (a) medio alcalino a pH13, (b) medio ácido a pH 1, Campillo-Fernández et al. [56]

Campillo-Fernández et al. ^[56] encontraron la explicación a estos comportamientos en la acción de los iones hidroxilo OH^- e hidronio H^+ . Cuando las muestras se sumergen en una disolución a pH 13 hay gran cantidad de iones OH^- disponibles y el GO actúa como un centro de reacción gracias a sus grupos funcionales, a través de los cuales los OH^- del medio alcalino pueden reaccionar con la matriz. De esta forma, los enlaces C-C del GO se rompen y se liberan iones H^+ al medio, que a su vez reaccionan con las cadenas de PCL y rompen los enlaces éster. Este proceso puede verse como una superposición de degradación alcalina y degradación ácida y es el causante de que la velocidad de degradación aumente con el porcentaje de GO. Sin embargo, la situación cambia a pH 1, ya que el GO se reduce en la disolución de HCl captando H^+ y liberando $\text{Cl}_2(g)$, lo cual reduce la disponibilidad de iones hidronio para romper los enlaces de la PCL.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Los materiales necesarios para llevar a cabo la síntesis y degradación de las muestras híbridas de PCL/GO(f) se listan a continuación. Los materiales con proveedores especificados se encuentran disponibles en los laboratorios del Centre for Biomaterials and Tissue Engineering (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia. Los proveedores no especificados pueden ser seleccionados libremente.

Para la síntesis de las muestras híbridas se necesitará agua milli-Q ultra pura, acetona, poly(ϵ -caprolactone) en forma de granza con un peso molecular de 43000-50000 Da del proveedor *Polysciences* en envase de 500 g y óxido de grafeno suministrado por la compañía *Graphenea* en frascos de 1 mg. Como fármaco se empleará doxorubicina en polvo con una pureza del 99%. Para la degradación de las muestras se necesitará hidróxido de sodio y agua milli-Q ultra pura. Adicionalmente, para la caracterización mediante HPLC se necesitará acetonitrilo y ácido acético.

3.2. Métodos

Se llevará a cabo la síntesis de unos híbridos de PCL/GO. Se fabricarán distintos tipos de muestras, en función del tiempo de sonicación empleado en el acondicionamiento del GO (0', 10', 30', 60', 120') y en función de la incorporación de fármaco al GO o la ausencia de él, de manera que se prepararán 10 muestras distintas, como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Nomenclatura de las muestras

	Tiempo de sonicación				
	t ₁ =0'	t ₂ =10'	t ₃ =30'	t ₄ =60'	t ₅ =120'
Con fármaco	PCL/GO(d)-t ₁	PCL/GO(d)-t ₂	PCL/GO(d)-t ₃	PCL/GO(d)-t ₄	PCL/GO(d)-t ₅
Sin fármaco	PCL/GO-t ₁	PCL/GO-t ₂	PCL/GO-t ₃	PCL/GO-t ₄	PCL/GO-t ₅

Estas 10 muestras, una vez fabricadas, serán troqueladas y se obtendrán las réplicas necesarias de cada una para que, al llevar a cabo el ensayo de degradación, se pueda extraer, al menos, tres réplicas para cada tiempo de degradación y ensayo propuesto según la Tabla 2.

La variación de estos parámetros permitirá estudiar, a través de distintas técnicas de caracterización, el efecto del tiempo de sonicación del GO en la estructura de las muestras, la interacción del fármaco con el soporte híbrido y el perfil de degradación de las muestras.

3.2.1. Síntesis del híbrido PCL/GO

- *Acondicionamiento del GO*

Como material de partida se utilizará un óxido de grafeno en polvo que se someterá a un proceso de sonicación en agua milli-Q ultrapura para garantizar una adecuada dispersión con el disolvente. La sonicación se llevará a cabo a un ratio GO-agua 2:1 y a cuatro tiempos de sonicación distintos: t₂=10'; t₃=30'; t₄=60'; t₅=120'. El t₁ corresponderá al GO sin sonicar, por lo que de la disolución de GO y agua 2:1 solo se extraerán cuatro muestras.

Se procederá pausando el sonicador a cada tiempo correspondiente para extraer cada vez una cuarta parte de la disolución y transferirla a un tubo cónico para centrifuga Falcon™, donde se hará precipitar el GO sonicado. A continuación, se retirará el sobrenadante y los cuatro tubos se introducirán en un desecador a vacío hasta que el agua se haya evaporado por completo.

- *Incorporación del fármaco al GO*

Para incorporar la doxorubicina al GO, se seguirá un protocolo basado en los métodos de Rasoulzadeh [46] y Justin [48]. Se preparará una disolución acuosa de óxido de grafeno al 0.01% en masa y se le añadirá 20mL de una disolución acuosa de doxorubicina (25 ppm en agua destilada). La mezcla se sonicará durante 8 horas y el exceso de doxorubicina se lavará usando agua destilada.

La carga de fármaco se medirá mediante espectroscopía UV-VIS, ya que se conoce que la doxorubicina absorbe a una longitud de onda de 480 nm. Para encontrar la relación entre la concentración de doxorubicina y la absorbancia UV, se elaborará una curva de calibrado mediante mediciones de la absorbancia UV de una serie de disoluciones de doxorubicina en agua con concentraciones conocidas.

La masa de doxorubicina disuelta (y no incorporada al GO) se calculará a partir de la concentración de doxorubicina disuelta multiplicada por el volumen total. De este modo, la carga de fármaco puede obtenerse mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Carga de fármaco} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{W_0 - W_d}{W_0} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde W_d es la masa de DOX disuelta y W_0 es la masa total de DOX añadida inicialmente.

- *Incorporación de PCL al complejo GO(d)*

La PCL será disuelta en acetona durante 2 horas mientras es agitada a 1000 rpm con ayuda de un agitador magnético [57]. A continuación, se añadirá un 1.5% en peso de la disolución de GO funcionalizado con doxorubicina y se mezclará durante 12 horas. La solución resultante será vertida en un molde de teflón y será introducida en un desecador a

temperatura ambiente, permitiendo que las muestras se sequen, dando lugar a unas muestras planas y circulares.

- *Incorporación de PCL al GO sin fármaco*

Para preparar las muestras sin fármaco se procederá de igual manera, omitiendo el paso de incorporación del fármaco. Se preparará entonces la disolución acuosa de óxido de grafeno al 0.01% en masa y se mezclará con la disolución de PCL en acetona a una concentración de 1.5% GO en peso en las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente se verterá la disolución en el molde de teflón y se introducirá en el desecador hasta la completa evaporación de los disolventes. Una vez se hayan obtenido los híbridos se troquelarán las muestras con ayuda de un troquel de 4 mm de diámetro. Deberán obtenerse al menos tres réplicas para cada uno de los tiempos de degradación especificados en Tabla 2.

3.2.2. Caracterización

Las 10 muestras fabricadas se someterán a un ensayo de degradación acelerada. El medio de degradación consistirá en una disolución de NaOH 2.5M con agua milli-Q a pH 13 que se preparará en un frasco ISO de 1L y que se distribuirá en viales Eppendorf de 2mL con ayuda de una micropipeta. Cada una de las muestras se pesará para conocer su masa inicial y se introducirá en un vial Eppendorf. Todos los viales se colocarán en una grada debidamente identificados y se introducirán a una estufa calefactada a 37°C donde se llevará a cabo el ensayo de degradación.

A determinados tiempos de degradación (ver Tabla 2) se extraerán tres réplicas para efectuar los ensayos allí descritos y así poder estudiar cómo influye la degradación del material en la liberación del fármaco y en las propiedades fisicoquímicas de las muestras híbridas PCL/GO y PCL/GO(d).

La cantidad de fármaco liberada se analizará por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por espectrografía ultravioleta-visible (UV-VIS). Los cambios morfológicos de las

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

muestras se estudiarán mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Las propiedades térmicas de los materiales se analizarán mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y mediante un análisis termogravimétrico (TGA).

Para realizar una caracterización coherente y organizada de las muestras, se ha elaborado una tabla con una serie de tiempos de degradación en horas, donde se ha marcado con una “x” aquellos ensayos de caracterización que se llevarán a cabo para cada uno de los tiempos de degradación.

Tabla 2. Esquema de los ensayos de caracterización según el tiempo de degradación.

t degradación (h)	FESEM y fotos	FTIR	Test de liberación UV-VIS / HPLC	DSC	Pérdida de masa
0	x	x	x	x	-
96	x		x		x
300	x		x	x	x
600	x	x	x		x
900	x		x	x	x
1300	x		x		x
1700	x	x	x	x	x

- *Ensayo de liberación del fármaco por degradación a pH 13: UV-VIS / HPLC*

El perfil de liberación del fármaco se obtendrá extrayendo las réplicas a los tiempos determinados en la Tabla 2 y analizando el sobrenadante por HPLC y UV-VIS para evaluar la liberación de doxorrubicina.

- **Caracterización con UV-VIS**

Para medir la cantidad liberada de fármaco a un tiempo dado, se cogerá una muestra del sobrenadante y se registrará su absorbancia mediante un espectroscopio UV-VIS, donde previamente se habrá realizado la curva de calibrado con diferentes concentraciones de DOX.

- **Caracterización con HPLC**

Se realizará también una caracterización de la liberación de doxorubicina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La separación se llevará a cabo en una columna C18 de fase reversa y se empleará como fase móvil una disolución de agua-acetonitrilo-ácido acético con ratios volumétricos 80:19:1 con pH 3, siguiendo el protocolo de Zhao et al ^[58]. Se fijará un caudal constante de 0.1mL/min.

Para cuantificar la cantidad de fármaco, se realizará una curva de calibrado, donde se calcularán las áreas de los picos en función de concentraciones de DOX determinadas. La concentración de doxorubicina liberada de los híbridos en el proceso de degradación se determinará a partir de la curva de calibrado, relacionando el área del pico con la concentración determinada por la calibración.

- *Pérdida de masa*

Para obtener el perfil de pérdida de peso en función del tiempo de las muestras de PCL/GO se realizarán medidas de peso a temperatura ambiente. Se procederá retirando las muestras a tiempos a 96h, 300h, 600h, 900h, 1300h y 1700h del medio de degradación. Se cogerán las muestras con sumo cuidado, se depositarán en papel absorbente para retirar el exceso de hidratación y se introducirán en un desecador a vacío para propiciar la evaporación del agua residual que pueda quedar retenida en las muestras.

La pérdida de peso de una muestra a un tiempo de degradación determinado se calculará como la diferencia entre el peso inicial y el peso seco una vez transcurrido el tiempo de degradación correspondiente, dividido por el peso inicial (Ec. 2).

$$\% \text{ Pérdida de peso a un tiempo } t = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso a tiempo } t}{\text{Peso inicial}} \quad \text{Ec. 2}$$

Mediante la obtención del perfil de pérdida de peso se pretende obtener una idea del tipo y velocidad de degradación del dispositivo biomédico, así como del tipo de degradación, características directamente relacionadas con la velocidad de liberación del fármaco anclado al GO.

- *Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)*

La microscopía electrónica FESEM permite visualizar detalles topográficos de pequeño tamaño en la superficie o en la totalidad de la muestra. Se recogerán imágenes generadas para cada una de las muestras de PCL/GO a distintos tiempos de degradación: 0h, 96h, 300h, 600h, 900h, 1300h y 1700h, y a diferentes aumentos (x1000 y x5000). Se comprobará si la desintegración de las muestras tiene lugar por erosión superficial, como muchos artículos sobre materiales basados en policaprolactona sugieren. En este caso, se observaría una degradación homogénea a lo largo de toda la superficie de la muestra.

- *Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)*

Las muestras se caracterizarán por FTIR a tiempo inicial, a 600h y a 1700h del ensayo de degradación. El espectro de infrarrojos de las muestras híbridas permitirá distinguir por la posición de los picos de absorción, los grupos funcionales superficiales del GO que contengan oxígeno, como los enlaces C=O de los grupos carboxilo y carbonilo, así como los grupos hidroxilo O-H.

Se caracterizará una muestra híbrida sin fármaco y otra muestra cargada con el fármaco, para observar las diferencias. Estudios anteriores sugieren ligeros cambios en los picos de C=O que se encuentran desplazados con respecto a la muestra sin fármaco, indicando una interacción satisfactoria del fármaco con el óxido de grafeno. ^[50]

- *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

Las muestras serán sometidas a un ensayo de calorimetría diferencial de barrido para determinar sus propiedades térmicas y el grado de cristalinidad. El ensayo consistirá en tres etapas:

- un primer calentamiento de -90°C a 90°C
- un enfriamiento otra vez hasta -90°C
- un segundo calentamiento para regresar a 90°C

El experimento se realizará para cuatro tiempos del ensayo de degradación: a tiempo inicial (0h) y a tiempos 300h, 900h y 1700h. El termograma DSC permitirá estimar la temperatura de las transiciones térmicas (vítrea, fusión, cristalización) de los híbridos PCL/GO, dando también información sobre el grado de cristalinidad del composite.

4. Conclusiones

El cumplimiento de los objetivos propuestos inicialmente ha dado lugar a un proyecto en el marco de la ingeniería química y biomédica con el que se pretende, por un lado, contribuir a la comprensión del estado actual de materiales híbridos polímero-carga inorgánica para aplicaciones en el campo de la liberación controlada de fármacos y, por otro lado, llevar a cabo el diseño de la fabricación y caracterización de dispositivos biodegradables de policaprolactona-óxido de grafeno para la liberación controlada de doxorubicina, con el objetivo de tratar cánceres que requieren quimioterapia durante un periodo prolongado. Las conclusiones principales del trabajo se pueden resumir en:

- Se ha mostrado la viabilidad de utilizar un material híbrido basado en PCL a la que se añade una pequeña cantidad de GO para suministrar doxorubicina durante un tiempo prolongado y de forma controlada.
- El GO proporciona el método de anclaje del fármaco al material.
- La incorporación del fármaco se verificará mediante una caracterización por FTIR midiendo las diferencias entre las muestras híbridas con fármaco y sin él.
- La influencia del tiempo de sonicación del GO, así como la presencia o ausencia de fármaco, se analizará mediante calorimetría diferencial de barrido que permitirá estudiar la variación de la temperatura de transición vítrea y el grado de cristalinidad.
- El mecanismo de liberación propuesto se basa en la lenta degradación del híbrido. De esta forma se consigue una liberación prolongada.
- La caracterización visual por FESEM y de pérdida de masa durante el ensayo de degradación realizado en medio básico, a pH13, permitirá predecir el comportamiento de la degradación en el plasma sanguíneo.
- La velocidad de liberación del fármaco se caracterizará por cromatografía HPLC y espectroscopía UV-VIS.

5. Bibliografía

- [1] Drug Delivery Systems: Getting Drugs to Their Targets in a Controlled Manner (2019). National institute of biomedical imaging and bioengineering. www.nibib.nih.gov
- [2] Fenton, O. S., Olafson, K. N., Pillai, P. S., Mitchell, M. J., & Langer, R. (2018). Advances in biomaterials for drug delivery. *Advanced Materials*, 30(29), 1705328.
- [3] Hoffman A. S. (2013). Chapter II.5.16 — Drug Delivery Systems: A, Introduction. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3rd edition)
- [4] Stewart, S. A., Domínguez-Robles, J., Donnelly, R. F., & Larrañeta, E. (2018). Implantable polymeric drug delivery devices: classification, manufacture, materials, and clinical applications. *Polymers*, 10(12), 1379.
- [5] Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822.
- [6] Huwyler, J., Wu, D., & Pardridge, W. M. (1996). Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 14164-14169.
- [7] Wilson C. G. (2013). Chapter II.5.16 — Drug Delivery Systems: G, Oral Drug Delivery. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3rd edition).
- [8] Kushal, M., Monali, M., Durgavati, M., Mittal, P., Umesh, S., & Pragna, S. (2013) Oral controlled release drug delivery system: an overview. *INTERNATIONAL RESEARCH JOURNAL OF PHARMACY*.
- [9] Hoffman A. S (2013). Chapter II.5.16 — Drug Delivery Systems: B.1., Injected Nanocarriers: Introduction. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3rd edition)

- [10] Hirsjarvi, S., Passirani, C., & Benoit, J. P. (2011). Passive and active tumour targeting with nanocarriers. *Current drug discovery technologies*, 8(3), 188-196.
- [11] Winau, F., Westphal, O., & Winau, R. (2004). Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. *Microbes and infection*, 6(8), 786–789.
- [12] Sayton P. S., Ghosn B., & Wilson J. T. (2013). Chapter II.5.16 — Drug Delivery Systems: B.3., Injected Nanocarriers: Targeting. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3rd edition)
- [13] Anarjan, F. S. (2019). Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 19, 100370.
- [14] Gombotz W. R. & Hoffman A.S. (2013). Chapter II.5.16 — Drug Delivery Systems: C, Injected Depot DDS. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3rd edition)
- [15] Gombotz, W. R., & Pettit, D. K. (1995). Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug. Chem.*, 6, 332–351.
- [16] Park, T. G. (1994). Degradation of poly(D, L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Control. Release*, 30, 161–173
- [17] Kumar, A.; Pillai, J. Implantable drug delivery systems. In *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 473–511
- [18] Stewart, S. A., Domínguez-Robles, J., Donnelly, R. F., & Larrañeta, E. (2018). Implantable polymeric drug delivery devices: classification, manufacture, materials, and clinical applications. *Polymers*, 10(12), 1379.
- [19] Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal drug delivery: innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438-470.

- [20] Hoffman A. S. (2013). Chapter II.5.16 — Drug Delivery Systems: A, Introduction. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3rd edition)
- [21] Fenton, O. S., Olafson, K. N., Pillai, P. S., Mitchell, M. J., & Langer, R. (2018). Advances in biomaterials for drug delivery. *Advanced Materials*, 30(29), 1705328.
- [22] Prestwich, G. D., & Luo, Y. (2001). Novel biomaterials for drug delivery. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 11(9), 1395-1410.
- [23] Kwon, G. S., & Furgeson, D. Y. (2007). Biodegradable polymers for drug delivery systems. In *Biomedical polymers* (pp. 83-110). Woodhead Publishing.
- [24] <https://www.clinimark.es/material-medico/sutura-vicryl-jonhson/>
- [25] American Cancer Society, Inc. (2020). Quimioterapia para la leucemia en niños. Cancer.org. URL: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-en-ninos/tratamiento/quimioterapia.html>
- [26] Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in polymer science*, 35(10), 1217-1256.
- [27] Martínez Ramón, V. (2019). Estudio de la degradación enzimática de híbridos de poli(e-caprolactona) con óxido de grafeno. *Trabajo fin de grado en ingeniería química*. Universidad Politécnica de Valencia.
- [28] TCI EUROPE N.V. Division of ROKYO CHEMICAL INDUSTRY. Printed Magazine TCIMAIL No.167(October 2015) <https://www.tcichemicals.com/en/us/support-download/tcimail/application/167-06.html>

- [29] Song, J., Gao, H., Zhu, G., Cao, X., Shi, X., & Wang, Y. (2015). The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors. *Carbon*, 95, 1039-1050.
- [30] Nematpour, N., Farhadian, N., Ebrahimi, K. S., Arkan, E., Seyedi, F., Khaledian, S., ... & Moradi, S. (2020). Sustained release nanofibrous composite patch for transdermal antibiotic delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 586, 124267.
- [31] Weng, F., Yin, J., Bao, F., Gao, J., Ma, R., Yan, S., ... & Ding, H. (2018). Preparation and the controlled release effect study of graphene oxide-modified poly (ϵ -caprolactone). *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(5), 307-312.
- [32] Wojtoniszak, M., Urbas, K., Perużyńska, M., Kurzawski, M., Drożdżik, M., & Mijowska, E. (2013). Covalent conjugation of graphene oxide with methotrexate and its antitumor activity. *Chemical Physics Letters*, 568, 151-156.
- [33] Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., & Dai, H. (2008). Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, 1(3), 203-212.
- [34] McCallion, C., Burthem, J., Rees-Unwin, K., Golovanov, A., & Pluen, A. (2016). Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 104, 235-250
- [35] Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y., & Chen, Y. (2008). High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(45), 17554-17558
- [36] Yang, X., Zhao, N., & Xu, F. J. (2014). Biocleavable graphene oxide based-nanohybrids synthesized via ATRP for gene/drug delivery. *Nanoscale*, 6(11), 6141-6150.yang

- [37] Mehrban, N., Teoh, G. Z., & Birchall, M. A. (2016). 3D bioprinting for tissue engineering: Stem cells in hydrogels. *International journal of bioprinting*, 2(1).
- [38] Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in polymer science*, 35(10), 1217-125
- [39] Davison, N. L., Barrère-de Groot, F., & Grijpma, D. W. (2014). Degradation of biomaterials. In *Tissue Engineering* (pp. 177-215). Academic Press.
- [40] Tojo, K., Aoyagi, H., & Kurita, T. (1998). Surface dissolution-bulk erosion model of drug release from biodegradable polymer rods. *Journal of chemical engineering of Japan*, 31(4), 648-651.
- [41] Vacanti CA, Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering using synthetic biodegradable polymers. In: Shalaby SW, Ikada Y, Langer R, Williams J, editors. *Polymers of biological and biomedical significance (ACS symposium series 540)*. Washington, DC: ACS; 1994
- [42] Castilla-Cortázar, I., Más-Estellés, J., Meseguer-Dueñas, J. M., Ivirico, J. E., Marí, B., & Vidaurre, A. (2012). Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly (ϵ -caprolactone) network. *Polymer Degradation and Stability*, 97(8), 1241-1248.
- [43] Gan, Z., Yu, D., Zhong, Z., Liang, Q., & Jing, X. (1999). Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone)/poly (DL-lactide) blends in phosphate buffer solution. *Polymer*, 40(10), 2859-2862.
- [44] Martínez-Ramón, V., Castilla-Cortázar, I., Vidaurre, A., & Campillo-Fernández, A. J. (2020). Production and enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone)/graphene oxide composites. *Materials Express*, 10(6), 866-876.
- [45] Ng, K. W., Khor, H. L., Achuth, H. N., Htay, A. S., Teoh, S. H., Moochhala, S., ... & Hutmacher, D. W. (2002). In vivo Evaluation of an ultra-thin substrate for

epidermal regeneration. In *Proceedings of the 11th International Conference on Biomedical Engineering*.

[46]Rasoulzadeh, M., & Namazi, H. (2017). Carboxymethyl cellulose/graphene oxide bio-nanocomposite hydrogel beads as anticancer drug carrier agent. *Carbohydrate polymers*, 168, 320-326.

[47]Wang, H., Sun, D., Zhao, N., Yang, X., Shi, Y., Li, J., ... & Wei, G. (2014). Thermo-sensitive graphene oxide-polymer nanoparticle hybrids: synthesis, characterization, biocompatibility and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(10), 1362-1370.

[48]Justin, R., & Chen, B. (2014). Characterisation and drug release performance of biodegradable chitosan-graphene oxide nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 103, 70-80.

[49]Mao, Z., Li, J., Huang, W., Jiang, H., Zimba, B. L., Chen, L., ... & Wu, Q. (2018). Preparation of poly (lactic acid)/graphene oxide nanofiber membranes with different structures by electrospinning for drug delivery. *RSC advances*, 8(30), 16619-16625.

[50]Kazempour, M., Edjlali, L., Akbarzadeh, A., Davaran, S., & Farid, S. S. (2019). Synthesis and characterization of dual pH-and thermo-responsive graphene-based nanocarrier for effective anticancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 54, 101158.

[51]Fan, L., Ge, H., Zou, S., Xiao, Y., Wen, H., Li, Y., ... & Nie, M. (2016). Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system. *International journal of biological macromolecules*, 93, 582-590.

[52]Htay, A. S., Teoh, S. H., & Hutmacher, D. W. (2004). Development of perforated microthin poly (ϵ -caprolactone) films as matrices for membrane tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(5), 683-700.

[53]Deliormanlı, A. M. (2019). Direct write assembly of graphene/poly (ϵ -caprolactone) composite scaffolds and evaluation of their biological

performance using mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(4), 1117-1133.

[54] Lee, S. H., Lee, J. H., & Cho, Y. S. (2014). Analysis of degradation rate for dimensionless surface area of well-interconnected PCL scaffold via in-vitro accelerated degradation experiment. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(6), 446-452.

[55] Sailema-Palate, G. P., Vidaurre, A., Campillo-Fernández, A. J., & Castilla-Cortázar, I. (2016). A comparative study on Poly (ϵ -caprolactone) film degradation at extreme pH values. *Polymer Degradation and Stability*, 130, 118-125.

[56] Campillo-Fernández, A. J., González-Reed, P., Vidaurre, A., & Castilla-Cortázar, I. (2020). Poly (ϵ -caprolactone)/graphene oxide composite systems: A comparative study on hydrolytic degradation at extreme pH values. *Materials Express*, 10(6), 892-902.

[57] Yadav, A. K., Mishra, P., Jain, S., Mishra, P., Mishra, A. K., & Agrawal, G. P. (2008). Preparation and characterization of HA-PEG-PCL intelligent core-corona nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Journal of drug targeting*, 16(6), 464-478.

[58] Zhao, P., & Dash, A. K. (1999). A simple HPLC method using a microbore column for the analysis of doxorubicin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 20(3), 543-548.

PRESUPUESTO

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

1. Cuadro de precios unitarios

1.1. Coste de mano de obra

Nº	Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total €
1	P.DRP	Director responsable del proyecto	24,00 €/h	26 h	624,00
2	P.CDR	Codirector del proyecto	22,00 €/h	18 h	396,00
3	P.TL	Técnico de laboratorio	11,50 €/h	5 h	57,50
4	P.IQ	Ingeniero Químico	15,20 €/h	300 h	4560,00
					5637,50

1.2. Coste de equipos

Nº	Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total (€)
1	E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,20 €/h	9,5 h	1,90
2	E.BCE	Banco con campana extractora	0,11 €/h	16 h	1,76
3	E.SV	Sonicador de varilla	0,11 €/h	10 h	1,10
4	E.C	Centrífuga	0,49 €/h	0,5 h	0,24
5	E.BU	Baño de ultrasonidos	0,11 €/h	0,5 h	0,055
6	E.D	Desecador	0,09 €/h	240 h	21,60
7	E.BV	Bomba de vacío	0,19 €/h	7,5 h	1,425
8	E.FESEM	Microscopio electrónico ZEISS Ultra-55	25,00 €/h	35 h	875,00
9	E.ENC	Encapsulador DSC	0,10 €/h	0,5 h	0,05
10	E.DSC	Calorímetro Perkin-Elmer DSC8000	0,34 €/h	28 h	9,52
11	E.HPLC	Columna HPLC C18 de fase reversa	0,40 €/h	24 h	9,60
12	E.UV	Perkin-Elmer Lambda 900 UV-VIS-NIR	0,39 €/h	70 h	27,30
13	E.FTIR	Espectroscopio IR Alpha	0,30 €/h	1 h	0,30
14	E.PH	pH-metro	0,10 €/h	1 h	0,10
15	E.AM	Agitador magnético	0,10 €/h	2	0,20
					950,16 €

1.3. Coste de productos y reactivos

Nº	Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total (€)
1	R.P	Policaprolactona	440,44 €/kg	0,2 kg	88,08
2	R.OG	Óxido de grafeno	53,85 €/g	0,65 g	36,30
3	R.AC	Acetona	4,83 €/L	10,5 L	50,71
4	R.HS	Hidróxido sódico	6,9 €/kg	0,5 kg	3,45
5	R.DOX	Doxorrubicina	32,13 €/kg	0,012 kg	0,38
6	R.AN	Acetonitrilo	18,05 €/L	0,5 L	9,02
7	R.AA	Ácido acético	4,06 €/L	0,5 L	2,03
8	R.NG	Nitrógeno gas	10,10 €/L	23,4 L	236,34
9	R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	2,08 L	4,37
10	R.H	Hielo	0,345€/ kg	3 kg	1,03
					431,72

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

1.4. Coste de materiales

Nº	Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total (€)
1	M.MT	Molde de teflón	0,17 €/ud	1 ud	0,17
2	M.VP01	Vaso de precipitados 100 mL	0,50 €/ud	2 ud	1,00
3	M.RV	Recipiente vidrio	0,30 €/ud	1 ud	0,30
4	M.PF	Parafilm	38,00 €/ud	1 ud	38,00
5	M.PA	Papel absorbente	0,05 €/ud	1 ud	0,05
6	M.T	Tijeras	0,60 €/ud	1 ud	0,60
7	M.J	Jeringuilla	0,14 €/ud	1 ud	0,14
8	M.PM	Pinzas metálicas	0,20 €/ud	1 ud	0,20
9	M.FI02	Frasco ISO 1 L	6,99 €/ud	1 ud	6,99
10	M.FI01	Frasco ISO 100 mL	5,31 €/ud	10 ud	53,10
11	M.PG	Pipeta graduada 10 mL	14,82€/ud	1 ud	14,82
12	M.PD	Pipeta desechable	0,3 €/ud	140 ud	42,00
13	M.MP	Micropipeta	230,00 €/ud	1 ud	230,00
14	M.EM	Espátula metal	4,21 €/ud	1 ud	4,21
15	M.PPP	Placa Petri	1,33 €/ud	1 ud	1,33
16	M.VV	Viales vidrio	0,13 €/ud	10 ud	1,30
17	M.TD	Troquel 4 mm	1,55 €/ud	1 ud	1,55
18	M.TT	Tabla para troquelar	20,00 €/ud	1 ud	20,00
19	M.BZ	Bolsa zip	0,20 €/ud	98 ud	19,60
20	M.RP	Rollo de papel	2,00 €/ud	1 ud	2,00
21	M.GL	Caja guantes de látex	5,85 €/ud	1 ud	5,85
22	M.GN	Caja guantes de nitrilo	7,29 €/ud	1 ud	7,29
23	M.BL	Bata de laboratorio	9,99 €/ud	1 ud	9,99
24	M.MG	Máscara de gases	40,30 €/ud	1 ud	40,30
25	M.MP	Máscara de polvo	10,00 €/ud	1 ud	10,00
26	M.TF01	Tubo Falcon	0,35 €/ud	10 ud	3,50
27	M.GTF	Grada tubos Falcon	12,40 €/ud	10 ud	124,00
28	M.CA	Cápsula de aluminio	2,83 €/ud	28 ud	79,24
29	M.RCA	Rollo de cinta adhesiva	1,28 €/ud	1 ud	1,28
30	M.PP	Papel de pesada	3,66 €/ud	1 ud	3,66
31	M.RP	Rotulador permanente	1,00 €/ud	2 ud	2,00
32	M.J	Jeringuilla de insulina	0,14 €/ud	1 ud	0,14
33	M.JHPLC	Jeringuilla HPLC con filtro	2,63 €/ud	10 ud	26,30
34	M.VHPLC	Viales HPLC	0,25 €/ud	10 ud	2,50
35	M.I	Imán	1,19 €/ud	1 ud	1,19
36	M.STUB	Portamuestras o "stubs"	3,01 €/ud	5 ud	15,05
37	M.BV	Bolsas de vacío	0,73 €/ud	30 ud	21,90
38	M.EPP	Eppendorfs 2 mL	0,08 €/ud	70 ud	2,48
					794,03

2. Cuadro de precios descompuestos

2.1. Fabricación y degradación de las muestras

2.1.1. Acondicionamiento del GO

Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total (€)
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,2 €/ud	0,5 h	0,10
E.SV	Sonicador de varilla	0,11 €/ud	2 h	0,22
E.C	Centrífuga	0,49 €/ud	0,5 h	0,25
E.D	Desecador	0,09 €/ud	72 h	6,48
E.BOV	Bomba de vacío	0,19 €/ud	0,5 h	0,02
R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	400 mL	0,13
R.H	Hielo	0,345 €/kg	1 kg	0,69
M.MT	Molde de teflón	0,17 €/ud	1 ud	0,17
R.OG	Óxido de grafeno	53,85 €/g	200 mg	3,23
M.VP01	Vaso de precipitados 100 mL	0,5 €/ud	1 ud	0,50
M.PP	Placa Petri	2,67 €/ud	1 ud	2,67
M.MP	Pipeta graduada 10 mL	14,82€/ud	1 ud	230,00
M.TF	Tubo Falcon	0,35 €/ud	10 ud	3,50
M.GTF	Grada tubos Falcon	12,40 €/ud	1 ud	37,20
M.FI01	Frasco ISO 100 mL	5,31 €/ud	10 ud	53,10
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	8 h	121,60
Total				459,86
			Costes directos	2%
				9,20
				469,06

2.1.2. Incorporación del fármaco al GO

Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total (€)
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,2 €/h	0,5 h	0,10
R.OG	Óxido de grafeno	53,85 €/g	0,4 g	21,54
R.DOX	Doxorrubicina	32,13 €/kg	0,002 kg	64,26
R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	0,5 L	1,05
E.SV	Sonicador de varilla	0,11 €/ud	8 h	0,22
M.VP01	Vaso de precipitados 100 mL	0,5 €/ud	1 ud	0,50
M.MP	Micropipeta	230 €/ud	1 ud	230,00
M.EM	Espátula metal	4,21 €/ud	1 ud	4,21
R.H	Hielo	0,345 €/kg	2 kg	0,69
M.FI01	Frasco ISO 100 mL	5,31 €/ud	5 ud	26,55
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	8 h	121,60
Total				470,72
			Costes directos	2%
				9,41
				480,13

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

2.1.3. Síntesis de los híbridos PCL/GO

Código	Descripción	Precio	Cantidad	Total (€)
R.P	Policaprolactona	440,44 €/kg	200 g	88,08
R.OG	Óxido de grafeno	53,85 €/g	50 mg	2,69
R.AC	Acetona	4,83 €/L	500 mL	2,41
R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	60 mL	0,13
M.MT	Molde de teflón	0,17 €/ud	1 ud	0,17
M.VP01	Vaso de precipitados 100 mL	0,50 €/ud	2 ud	1,50
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,2 €/ud	0,5 h	0,10
E.BCE	Banco con campana extractora	0,11 €/h	1 h	0,11
E.BU	Baño de ultrasonidos	0,11 €/h	0,5	0,55
E.D	Desecador	0,09 €/h	168	15,12
E.BV	Bomba de vacío	0,19 €/h	7	1,33
E.AM	Agitador magnético	0,10 €/h	2 h	2,40
M.I	Imán	1,19 €/ud	1 ud	1,19
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	24 h	364,80
	Total			480,09
	Costes directos		2%	9,60
				489,69

2.1.4. Ensayo de degradación

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	60 mL	0,13
R.HS	Hidróxido sódico	6,9 €/kg	500 g	3,45
M.FI02	Frasco ISO 1 L	6,99 €/ud	1 ud	6,99
E.BCE	Banco con campana extractora	0,11 €/h	14	1,54
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,20 €/h	1,5 h	0,30
M.EM	Espátula metal	4,21 €/ud	1 ud	4,21
M.PG	Pipeta graduada 10 mL	14,82€/ud	1 ud	14,82
E.PH	pH-metro	0,1 €/h	1 ud	0,10
M.EPP	Eppendorfs 2 mL	0,08 €/ud	70 ud	5,60
M.MP	Micropipeta	230 €/ud	1 ud	230,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	40 h	608,00
	Total			875,14
	Costes directos		2%	17,50
				892,64

2.1.5. Otros instrumentos

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
M.PF	Parafilm	38,00 €/ud	1 ud	38,00
M.PA	Papel absorbente	0,05 €/ud	1 ud	0,05
M.T	Tijeras	0,60 €/ud	1 ud	0,60
M.J	Jeringuilla de insulina	0,14 €/ud	1 ud	0,14
M.RCA	Rollo de cinta adhesiva	1,28 €/ud	1 ud	1,28

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

M.RP	Rotulador permanente	1,00 €/ud	2 ud	2,00
	Total			42,07
	Costes directos		2%	0,84
				42,91

2.2. Caracterización

2.2.1. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS)

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,20 €/h	4 h	0,30
M.PM	Pinzas metálicas	0,20 €/ud	1 ud	0,20
E.UV	Perkin-Elmer Lambda 900 UV-VIS-NIR	0,39 €/h	70 h	27,30
R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	1 L	0,13
R.DOX	Doxorrubicina	32,13 €/kg	5 g	0,16
M.VV	Viales vidrio	0,13 €/ud	10 ud	0,91
M.PD	Pipeta desechable	0.3 €/ud	70 ud	21,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	42 h	638,40
	Total			688,40
	Costes directos		2%	13,77
				702,17

2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,20 €/h	1,5 h	0,30
M.PM	Pinzas metálicas	0,20 €/ud	1 ud	0,20
E.HPLC	Columna HPLC C18 de fase reversa	0,40 €/h	24 h	9,60
R.AMQ	Agua milli-Q	2,10 €/L	60 mL	0,13
R.AN	Acetonitrilo	18,05 €/L	500 mL	9,03
R.AA	Ácido acético	4,06 €/L	500 mL	2,03
R.DOX	Doxorrubicina	32,13 €/kg	5 g	0,16
M.VV	Viales vidrio	0,13 €/ud	10 ud	0,91
M.JHPLC	Jeringuilla HPLC con filtro	2,63 €/ud	10 ud	18,41
M.VHPLC	Viales HPLC	0,25 €/ud	10 ud	1,75
M.PG	Pipeta graduada 10 mL	14,82€/ud	1 ud	14,82
M.PD	Pipeta desechable	0.3 €/ud	70 ud	21,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	42 h	638,40
	Total			716,74
	Costes directos		2%	14,33
				731,07

2.2.3. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
E.MEZ	Microscopio electrónico ZEISS Ultra-55	25 €/h	35 h	250,00

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

E.BCE	Banco con campana extractora	0,11 €/h	1 h	0,11
R.CC	Cemento al carbono	0,44 €/g	10 g	4,43
M.BZ	Bolsa zip	0,20 €/ud	70 ud	4,00
M.STUB	Portamuestras o "stubs"	3,01 €/ud	5 ud	48,16
M.PM	Pinzas metálicas	0,20 €/ud	1 ud	0,20
M.BV	Bolsas de vacío	0,73 €/ud	30 ud	11,68
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	40 h	608,00
Total				926,58
Costes directos			2%	18,53
				945,11

2.2.4. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
E.FTIR	Espectroscopio IR Alpha	0,3 €/ud	1 h	0,30
M.PM	Pinzas metálicas	0,20 €/ud	1 ud	0,20
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	22 h	334,40
Total				334,90
Costes directos			2%	6,70
				341,60

2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
E.BAP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,2 €/h	1 h	0,10
M.PM	Pinzas metálicas	0,20 €/ud	1 ud	0,20
E.ENC	Encapsulador	0,10 €/h	0,5 h	0,05
M.CA	Cápsulas de aluminio	2,83€/ud	28 ud	56,60
M.BZ	Bolsa zip	0,20 €/ud	28 ud	4,00
E.CPE	Calorímetro Perkin-Elmer DSC8000	0,34 €/h	28 h	6,63
E.APE	Analizador Perkin-Elmer DMA8000	0,46 €/h	8 h	1,84
R.NG	Nitrógeno gas	10,10 €/L	23,40 L	236,34
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	30 h	456,00
Total				761,76
Costes directos			2%	15,24
				777,00

2.3. Limpieza de instrumentación

2.3.1. Limpieza de útiles e instrumentación

Código	Designación	Precio unitario	Cantidad	Total (€)
R.ET	Etanol	4,83 €/L	13,50 L	65,21
R.AC	Acetona	4,83€/L	10,00 L	48,30
R.AD	Agua destilada	0,20 €/L	10,00 L	2,00
M.RP	Rollo de papel	2,00 €/ud	1 ud	2,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	6 h	91,20

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

	Total	208,71
Costes directos	2%	4,17
		212,88

2.4. Reuniones

2.4.1. Reuniones de planificación

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
P.DRP	Director responsable del proyecto	24,00 €/h	8 h	192,00
P.CDR	Codirector del proyecto	22,00 €/h	2 h	44,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	8 h	228,00
	Total			464,00
	Costes directos		2%	9,28
				473,28

2.4.2. Reuniones de seguimiento

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
P.DRP	Director responsable del proyecto	24,00 €/h	10 h	240,00
P.CDR	Codirector del proyecto	22,00 €/h	8 h	176,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	10 h	152,00
	Total			568,00
	Costes directos		2%	11,36
				579,36

2.4.3. Revisiones y correcciones

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
P.DRP	Director responsable del proyecto	24,00 €/h	8 h	192,00
P.CDR	Codirector del proyecto	22,00 €/h	8 h	176,00
P.IQ	Ingeniero químico	15,20 €/h	20 h	304,00
	Total			672,00
	Costes directos		2%	13,44
				685,44

2.5. Equipos de protección individual y seguridad (EPIS)

2.5.1. Equipos de protección

Código	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
M.BL	Bata de laboratorio	9,99 €/ud	1 ud	9,99
M.GL	Caja guantes látex	5,85€/ud	1 ud	5,85
M.GN	Caja guantes nitrilo	7,29 €/ud	1 ud	7,29
M.GATB	Guantes temperaturas bajas	5,10 €/ud	1 ud	5,10
M.MG	Máscara de gases	40,30 €/ud	1 ud	40,30

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

M.MP	Máscara de polvo	10,00 €/ud	1 ud	10,00
	Total			78,53
	Costes directos		2%	1,57
				80,10

3. Presupuesto de ejecución por contrata

Presupuesto parcial 1. Fabricación y degradación de las muestras

Código	Actividad	Total (€)
1.1	Acondicionamiento del GO	469,06
1.2	Incorporación del fármaco al GO	480,13
1.3	Síntesis de los híbridos	489,69
1.4	Ensayo de degradación	892,64
1.5	Otros instrumentos	42,91
		1.481,79

Presupuesto parcial 2. Caracterización

Código	Actividad	Total (€)
2.1	Espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS)	702,17
2.2	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	731,07
2.3	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	945,11
2.4	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	341,60
2.5	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	777,00
		3.496,94

Presupuesto parcial 3. Limpieza de instrumentación

Código	Actividad	Total (€)
3.1	Limpieza de instrumentación	212,88
		212,88

Presupuesto parcial 4. Reuniones

Código	Actividad	Total (€)
4.1	Reuniones de planificación	473,28
4.2	Reuniones de seguimiento	579,36
4.3	Revisiones y correcciones	685,44
		1.738,08

Presupuesto parcial 5. Equipos de protección individual y seguridad (EPIS)

Código	Actividad	Total (€)
--------	-----------	-----------

ANÁLISIS DE HÍBRIDOS DE POLÍMERO-ÓXIDO DE GRAFENO PARA APLICACIONES EN
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

5.1	Equipos de protección	80,10
		80,10

Resumen

Código	Actividad	Total (€)
Capítulo 1	Fabricación y degradación de las muestras	2.374,43
Capítulo 2	Caracterización	3.496,94
Capítulo 3	Limpieza de instrumentación	212,88
Capítulo 4	Reuniones	1.738,08
Capítulo 5	Equipos de protección individual y seguridad (EPIS)	80,10
Presupuesto de ejecución material		7.902,44
13% Gastos generales		1.027,32
6% Beneficio industrial		474,15
Presupuesto de ejecución por contrata		9.403,90
21% IVA		1.974,82
Presupuesto total		11.378,72

Asciende el presente presupuesto a la expresada cantidad de ONCE MIL TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO EUROS CON SETENTA Y DOS CÉNTIMOS