



Universidad
Zaragoza

Trabajo de Fin de Máster

Síntesis de nanopartículas de PLGA con verde de
indocianina para terapia fotodinámica
antimicrobiana
Synthesis of PLGA nanoparticles with indocyanine
green for antimicrobial photodynamic therapy

Autora

Isabel Bescós Torcal

Director

Victor Sebastián Cabeza

Manuel Arruebo Gordo

MÁSTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA
2020/2021

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Cristina Yus Argón por su ayuda y sus consejos a lo largo de estos meses, agradecer a Teresa Alejo por ayudarme a empezar con motivación este proyecto. También quiero agradecer a mis directores Victor Sebastián y Manuel Arruebo por confiar en mi para este proyecto y por el apoyo que me han dado. Quiero agradecer a los compañeros de laboratorio con los que he coincidido ya que los he podido conocer personalmente y me llevo una buena experiencia con ellos. Por último pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos por su apoyo incondicional a lo largo de estos meses.

Síntesis de nanopartículas de PLGA con verde de indocianina para terapia fotodinámica antimicrobiana

Resumen

En los últimos años está teniendo lugar un rápido aumento en el número de especies bacterianas resistentes a antibióticos debido al uso inapropiado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Por ello, cada vez hay más infecciones que son difíciles de tratar. Para superar este problema, la comunidad científica está experimentando un cambio hacia el tratamiento de las enfermedades infecciosas con terapias antimicrobianas alternativas. Este trabajo se centra en el tratamiento de infecciones tópicas *in vitro* causadas por la bacteria gram-positiva *Staphylococcus Aureus* con una terapia antimicrobiana denominada terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT).

La aPDT se basa en la aplicación de un compuesto no tóxico llamado fotosensibilizador (PS). En nuestros experimentos se utilizó verde de indocianina (ICG) como PS. El ICG puede ser activado por la luz láser en el infrarrojo cercano (NIR) para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia del oxígeno del tejido. Estas ROS tienen un efecto citotóxico necesario para inactivar a los microorganismos. Sin embargo, el ICG tiene algunas limitaciones como la degradación en disolución acuosa, acelerada por la luz y la temperatura. El objetivo de este estudio es la encapsulación de ICG en nanopartículas (NPs) de poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) para superar estas limitaciones y evaluar su efecto antimicrobiano.

Con nuestros experimentos se demostró que la aPDT utilizando NPs de PLGA-ICG es una buena alternativa para el tratamiento de infecciones tópicas ya que muestra un alto efecto antimicrobiano por la generación de ROS. Se han comparado dos métodos de síntesis de NPs de PLGA-ICG: emulsión con evaporación del disolvente en discontinuo mediante el uso de ultrasonidos y emulsión con evaporación del disolvente en continuo mediante el micromezclado de fases por tecnología microfluídica.

La preparación de este vector ha exigido establecer numerosos protocolos y procedimientos de encapsulación, determinación analítica y caracterización morfológica y estructural. También se ha hecho frente a problemas de estabilidad en los diferentes medios acuosos en los que se ha dispersado el vector para su aplicación en aPDT. La emulsión doble en discontinuo ha resultado ser la técnica de síntesis más adecuada, con una carga de ICG de 0.85 ± 0.05 %. Con esta técnica de síntesis se obtuvieron NPs de PLGA-ICG con un diámetro hidrodinámico de 170.0 ± 47.00 nm. Los estudios de estabilidad y liberación demostraron, respectivamente, que la encapsulación de ICG en NPs de PLGA protege al ICG de la degradación y que estas NPs liberan durante las primeras 24 horas un 7.71 ± 3.23 % de ICG en PBS, medio salino en el que se realizan los estudios para simular condiciones fisiológicas. Se evaluó la actividad fototérmica y se demostró que el efecto de estas NPs era puramente fotodinámico. Es decir, el PS utilizado inactiva a los microorganismos cuando es irradiado debido a las ROS generadas (actividad fotodinámica) y no debido al aumento de temperatura (actividad fototérmica). El mayor efecto antimicrobiano se produjo con una incubación de 24 horas antes de la irradiación, obteniendo hasta una reducción de CFUs/mL de 99.953 %.

Synthesis of PLGA nanoparticles with indocyanine green for antimicrobial photodynamic therapy

Abstract

In recent years there has been a rapid increase in the number of antibiotic-resistant bacterial species due to the inappropriate use of antibiotics for the treatment of infectious diseases. This has led to an increasing number of infections becoming more difficult to treat. To overcome this problem, the scientific community is experiencing a shift towards treating infectious diseases with alternative antimicrobial therapies. Given this context, this work focuses on treating topical infections *in vitro* caused by the gram-positive bacteria *Staphylococcus Aureus* with an antimicrobial therapy named antimicrobial photodynamic therapy (aPDT).

aPDT is based on the application of a non-toxic compound called photosensitizer (PS). We use in our experiments indocyanine green (ICG) as our PS. ICG can be activated by laser light in the near infrared (NIR) to generate reactive oxygen species (ROS) in the presence of tissue oxygen. These ROS have a cytotoxic effect needed to inactivate the microorganisms. However, ICG has some limitations such as degradation in aqueous solution, accelerated by light and temperature. The aim of this study is the encapsulation of ICG in poly(D,L-lactic-co-glycolic) (PLGA) nanoparticles (NPs) to overcome these limitations and evaluate its antimicrobial effect.

We prove with our experiments that aPDT using PLGA-ICG NPs is a good alternative for the treatment of topical infections as it shows a high antimicrobial effect due to the generation of ROS. Two synthesis methods for PLGA-ICG NPs have been compared: batch emulsion with solvent evaporation using ultrasound and continuous emulsion with solvent evaporation using microfluidic technology.

The preparation of this vector has required the establishment of numerous protocols and procedures for encapsulation, analytical determination and morphological and structural characterization. We have faced problems of stability in the different aqueous media in which the vector has been dispersed for application in aPDT. Batch double emulsion has proved to be the most suitable synthesis technique with an ICG loading of 0.85 ± 0.05 %. We obtained PLGA-ICG NPs with a hydrodynamic diameter of 170.0 ± 47.0 nm with this synthesis technique. The stability and releasing studies proved respectively that encapsulation of ICG in PLGA NPs protects ICG from degradation and that these NPs release during the first 24 hours 7.71 ± 3.23 % ICG in PBS, the saline medium in which the studies are carried out to simulate physiological conditions. The photothermal activity was evaluated and the effect of these NPs was shown to be purely photodynamic. In other words, the PS inactivates microorganisms when it is irradiated due to the ROS generated (photodynamic activity) instead of to the temperature increase (photothermal activity). The greatest antimicrobial effect occurred with a 24-hour incubation prior to irradiation with a reduction of CFUs/mL upon 99.953 %.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Contexto	1
1.2	Terapia fotodinámica antimicrobiana	2
1.2.1	Fotosensibilizadores químicos	3
1.2.2	Fuente de luz	6
1.2.3	Oxígeno molecular	6
1.3	¿Por qué el uso de nanopartículas?	7
1.4	Metodología	8
1.5	Objetivos	10
1.6	Estructura de la memoria	10
2	Materiales y métodos	11
2.1	Equipos y reactivos	11
2.2	Síntesis de nanopartículas	11
2.2.1	Síntesis en discontinuo: emulsión-evaporación simple y doble mediante el uso de ultrasonidos	11
2.2.2	Síntesis en continuo: emulsión-evaporación simple y doble mediante tecnología microfluídica	12
2.3	Determinación de la carga de fármaco, eficiencia de encapsulación y balance de materia	12
2.4	Espectroscopía ultravioleta-visible, UV-vis	14
2.5	Caracterización de las NPs	14
2.5.1	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	14
2.5.2	Potencial zeta	14
2.5.3	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	14
2.5.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	15
2.5.5	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	15
2.6	Estudio de estabilidad de las NPs de PLGA-ICG y del ICG libre	15
2.7	Estudio de liberación del ICG de las NPs	15
2.8	Cuantificación de ROS	16
2.9	Actividad fototérmica	16
2.10	Actividad antimicrobiana	16
2.11	Análisis estadístico	17
3	Resultados y discusión	19
3.1	Determinación de la carga, eficiencia de encapsulación y balance de materia.	19
3.2	Caracterización por espectrofotometría UV-vis	20

3.3	Caracterización de las NPs	21
3.3.1	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	21
3.3.2	Potencial zeta	22
3.3.3	FTIR	22
3.3.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	23
3.3.5	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	23
3.4	Estudio de estabilidad de las NPs	24
3.5	Estudio de liberación del ICG de las NPs	25
3.6	Cuantificación de ROS	27
3.7	Actividad fototérmica	28
3.8	Actividad antimicrobiana	29
4	Conclusiones	31
	Anexos	45
A	Síntesis de nanopartículas	47
A.1	Protocolo de emulsión-evaporación simple y doble mediante el uso de ultrasonidos.	47
A.1.1	Proceso de optimización del lavado	48
A.2	Protocolo de emulsión-evaporación simple y doble mediante tecnología microfluídica.	48
B	Materiales y métodos	51
B.1	Curvas de calibración utilizadas para la determinación de DL y EE. . .	51
B.2	Espectrofotometría Ultravioleta-visible (UV-vis)	51
B.3	Caracterización de las NPs	51
B.3.1	Dynamic Light Scattering (DLS)	51
B.3.2	Potencial zeta	52
B.3.3	FTIR	52
B.3.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
B.3.5	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	53
B.4	Estudio de estabilidad de las NPs de PLGA-ICG y del ICG libre	53
B.5	Estudio de liberación del ICG de las NPs	53
B.6	Cuantificación de ROS	54
B.7	Actividad fototérmica	54
B.8	Actividad antimicrobiana	54
C	Resultados y discusión	57
C.1	Determinación de la carga de fármaco, eficiencia de encapsulación y balance de materia.	57
C.2	Caracterización de las NPs	57
C.2.1	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	57
C.2.2	Potencial zeta	58
C.2.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	58
C.3	Presencia de un agente estabilizante en las NPs de PLGA-ICG	59
C.3.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las NPs de PLGA-ICG-BSA	60
C.4	Estudio de la cinética de liberación	61

C.4.1	Ajuste matemático de la cinética de liberación	61
D	Diagrama de Gantt	63

Capítulo 1

Introducción

1.1 Contexto

El descubrimiento de los antibióticos fue una de las principales revoluciones para la salud pública a lo largo del siglo XX [1]. Sin embargo, el rápido aumento del número de especies bacterianas multirresistentes a antibióticos puede estar poniendo fin a un periodo que se ha extendido durante los últimos 50 años, llamado "la era de los antibióticos"[2]. El uso inapropiado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas ha contribuido a un excesivo consumo de los mismos en la última mitad del siglo XX y a la aparición de bacterias resistentes a los mismos [3]. Por tanto, cada vez es mayor el número de infecciones cuyo tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos [4]. Algunos estudios estiman que el número de muertes anuales debido a la resistencia a antibióticos se incrementará alarmantemente hasta alcanzar 10 millones en el año 2050 comparado con el número de muertes al año que se producen actualmente (700000 aproximadamente) [5, 6]. Complementariamente, la resistencia a antibióticos prolonga las estancias hospitalarias, los costes del tratamiento y, además, aumenta la mortalidad y morbilidad [2].

Desde el punto de vista de la dermatología, la piel es una de las primeras líneas de defensa contra la invasión microbiana [7]. Las fisuras de la piel (como traumatismo, incisión quirúrgica, quemaduras, *etc*) permiten la penetración de patógenos bacterianos, que pueden dar lugar a infecciones en la piel y en los tejidos blandos [8]. Las infecciones bacterianas tópicas representan algunas de las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo. El patógeno *Staphylococcus aureus* es una bacteria gram-positiva que forma parte de la flora normal de la piel y del tracto respiratorio humano. Tiene un gran potencial para causar una amplia gama de infecciones clínicas (infecciones tópicas especialmente) [9]. Históricamente, *S. aureus* ha sido uno de los patógenos responsables de una gran parte de las infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados vulnerables [10, 1]. Sin embargo, con el aumento de la resistencia a antibióticos, este patógeno se está convirtiendo en una grave amenaza para la salud mundial.

Hoy en día, el tratamiento de las infecciones cutáneas se realiza mediante la aplicación de un agente antimicrobiano tópico, que puede ser un antibiótico (como mupirocina o ácido fusídico) o antiséptico (clorhexidina o alcohol) [7]. El uso de antibióticos tópicos ofrece ventajas como su aplicación directa en el lugar de acción requerido, lo que reduce la toxicidad sistémica. Sin embargo, como ya se ha comentado, su uso generalizado provoca el aumento de resistencia bacteriana, limitando así su eficacia. Por otra parte, los antisépticos tópicos desempeñan un papel fundamental en la prevención de infec-

ciones nosocomiales y son componentes clave en la limpieza y control de infecciones en hospitales [10]. Una ventaja del uso de los agentes antisépticos es su menor resistencia bacteriana en comparación con el uso de antibióticos ya que los antibióticos tienen normalmente un único mecanismo de acción y los antisépticos varios. Esto hace que las probabilidades de que las bacterias desarrollen mutaciones que fomenten la resistencia a múltiples acciones antimicrobianas sean menores. Sin embargo, el uso rutinario de los agentes antisépticos está menos regulado, lo que hace que la preocupación sobre el desarrollo de la resistencia a estos sea mayor [7].

Por todo lo indicado, el aumento del número de bacterias multirresistentes a antibióticos está dando lugar a un gran esfuerzo de investigación para descubrir terapias antimicrobianas alternativas, entre las cuales se encuentra la terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT) [11].

1.2 Terapia fotodinámica antimicrobiana

La aPDT se ha desarrollado debido a la necesidad urgente de tratar infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos [9]. Se basa en la aplicación de un compuesto no tóxico, llamado fotosensibilizador (PS), que puede ser activado por la luz a una longitud de onda determinada para generar, en presencia de oxígeno del tejido, especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son nocivas para las células bacterianas [4].

El concepto de terapia fotodinámica (PDT) data de 1900, siendo sus primeros esfuerzos dirigidos hacia terapias contra el cáncer mientras que se introdujo por primera vez en 1960 como terapia antibacteriana. Los progresos realizados en aPDT se paralizaron debido al descubrimiento de los antibióticos y sus propiedades bactericidas. En los últimos años ha aumentado el interés hacia esta terapia antimicrobiana debido al rápido aumento de la resistencia a los antibióticos [12]. Este enfoque prometedor se ha propuesto como terapia para el tratamiento de una gran variedad de infecciones de heridas localizadas, especialmente en partes del cuerpo de fácil acceso, donde la propagación de la luz no es un inconveniente [6]. La aPDT ha sido investigada *in vitro* desde 1990 y ha demostrado ser eficaz, tanto *in vitro* como *in vivo*, contra bacterias patógenas [13].

Esta terapia presenta numerosas **ventajas** para el tratamiento de infecciones bacterianas en comparación con las terapias convencionales:

1. Capacidad de eliminar microorganismos con una rápida inactivación de estos [3].
2. Es una terapia no invasiva [14].
3. Efectos secundarios limitados ya que el PS se aplica localmente en el lugar de la infección [4, 11].
4. No se ha reportado ningún caso en el que se haya desarrollado resistencia a esta terapia. Esto se explica por que la aPDT afecta a múltiples funciones celulares (como la interacción con el ADN o integridad de la membrana) mientras que los antibióticos suelen afectar a una única función celular [6, 11, 4].
5. Efectiva para tratar tanto bacterias gram-positivas (*S. aureus*) como bacterias gram-negativas (*E. Coli*) [15].

En cuanto a este último punto, se ha demostrado que la aPDT es más efectiva en eliminar bacterias gram-positivas que bacterias gram-negativas ya que estas últimas son más resistentes a varios PSs comúnmente utilizados en aPDT. Esto es debido a las diferencias estructurales que presentan en la membrana citoplasmática. Las bacterias gram-positivas presentan una membrana citoplasmática rodeada por una capa porosa de peptidoglicano (Figura 1.1), lo que permite al PS aniónico o neutro unirse eficazmente a estas bacterias para su posterior fotoinactivación [3, 2]. Por el contrario, las bacterias gram-negativas presentan una compleja membrana externa con bicapas lipídicas que sirven de barrera física entre la célula y su entorno, lo que dificulta la entrada del PS al citoplasma de la bacteria [16]. Sin embargo, este tipo de bacterias presentan cargas superficiales negativas, por lo que son capaces de atraer PSs catiónicos, lo cual facilita el proceso de difusión, mejorando la acción fotodinámica [17].

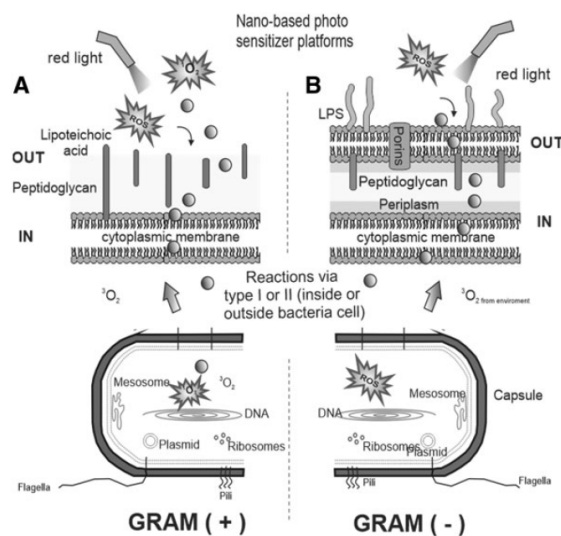


Figura 1.1: Mecanismo de la fotoinactivación de las bacterias gram-positivas y gram-negativas basadas en la nanotecnología [15].

A continuación se describen los tres componentes principales que intervienen en la aPDT:

1.2.1 Fotosensibilizadores químicos

Las moléculas fotosensibilizadoras son compuestos químicos que, bajo la aplicación de una fuente de luz, generan ROS [14]. Es importante que el PS utilizado en aPDT cumpla algunos requisitos como los que se nombran a continuación:

1. Baja toxicidad [12].
2. Capacidad de localizarse preferentemente en la infección a tratar [14].
3. Que haya un corto tiempo entre la administración del PS y la acumulación en las bacterias objetivo [12].
4. Que no se acumule en tejidos sanos. Si no es así, que la eliminación de los tejidos sanos sea relativamente rápida para minimizar efectos secundarios [12].

5. Que se active gracias a la exposición a una fuente de luz a una longitud de onda determinada, la cual permita una suficiente penetración de la luz en el tejido [14].
6. Que tenga un alto rendimiento cuántico que conduzca a una buena producción de ROS tras el proceso de irradiación [12, 18].

Se han probado muchos PSs para esta terapia tanto *in vitro* como *in vivo* [2]. En la Tabla 1.1 se recogen los PSs utilizados más frecuentemente en aPDT.

PS	Descripción	Ref.
Azul de metileno	Banda de absorción en la región 600-700 nm (luz visible).	
	PS sintético, hidrofílico, catiónico, baja toxicidad.	[11]
	Eficaz contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.	[2]
	Utilizado inicialmente contra la malaria. Tratamiento contra el cáncer, marcador de tejidos en cirugía.	[3]
Azul de Toluidina	Banda de absorción en la región 600-700 nm (luz visible).	[11]
	PS sintético, hidrofílico, catiónico, baja toxicidad.	[3]
	Eficaz contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.	[18]
Verde de indocianina	Banda de absorción en la región 700-950 nm (rango del NIR).	
	PS anfifílico, aniónico, baja toxicidad.	
	Eficaz contra bacterias gram-positivas. Diagnóstico por imagen como agente de contraste para reconocimiento de tumores. Evaluación de la función hepática, cardíaca y oftalmológica.	[19] [20]
Curcumina	Banda de absorción en el rango 300-500 nm (luz visible).	
	PS natural, de bajo coste, solubilidad en agua limitada. Uso tópico para tratar heridas superficiales.	[3] [20]
Rosa de bengala	Banda de absorción en el rango 480-550 nm (luz visible).	
	PS hidrofílico, aniónico.	[11]
	Más utilizado contra las bacterias gram-positivas. Usado en oftalmología para el diagnóstico de enfermedades.	[3] [18]

Tabla 1.1: Principales características de los PSs más utilizados en aPDT.

Hasta la fecha, únicamente el azul de metileno, azul de toluidina y verde de indocianina han sido aprobados para su uso clínico [9]. En este trabajo se va a utilizar verde de indocianina (ICG) como PS, que presenta una fuerte absorción en el rango del NIR (700-800 nm). Este compuesto está aprobado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado en la clínica [16]. La mayoría de aplicaciones del ICG están basadas en su propiedad de fluorescencia [21]. El ICG se empleó originalmente como herramienta de diagnóstico médico en el campo de evaluación del esfuerzo cardíaco y para monitorizar la función hepática [22, 23]. La investigación de las propiedades fluorescentes del ICG en 1970 amplió su uso en otros campos quirúrgicos, como en oftalmología, urología y cirugía general para la evaluación de la perfusión del tejido. Además, es utilizado para tratamiento de tumores, como carcinoma de colon o hepatocelular [19].

Entre las **ventajas** del ICG se encuentran las siguientes:

1. Baja toxicidad [22].
2. Bajo coste en comparación con otros PSs [14].
3. Fuerte absorción en el rango del NIR [20]. Como la mayoría de moléculas presentes en el organismo no absorben ni emiten luz en el rango del NIR las señales emitidas por el ICG están libres de interferencias [22]. Además, al absorber fuertemente en el rango del NIR, la profundidad de penetración de la luz en tejidos biológicos es mayor en comparación con otros PSs, que absorben a longitudes de onda en el rango de la luz visible [21].

Sin embargo, el ICG presenta ciertas **limitaciones** que se nombran a continuación:

1. En solución acuosa, el ICG presenta agregación a mayores concentraciones (estudios han demostrado que a una concentración a partir de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se produce agregación del ICG en solución acuosa) [23]. Esta agregación dependiente de la concentración es debido a la dimerización que sufre el ICG a mayores concentraciones [22, 14] siendo debido a las fuerzas de Van der Waals que se producen entre las moléculas [23]. Debido al proceso de agregación, el ICG sufre un proceso de desactivación de fluorescencia (en inglés *quenching*), que lleva a una disminución en la señal de fluorescencia que se produce por el solapamiento del espectro de absorción y emisión de fluorescencia [21, 23].
2. En solución acuosa, el ICG sufre una degradación óptica que es acelerada por la exposición a la luz y a altas temperaturas [20, 21]. Esta degradación resulta en una decoloración y en la disminución de la absorbancia y fluorescencia [24].
3. Fotoblanqueo, es decir, la destrucción fotoquímica del ICG como consecuencia de la irradiación [14]. Esta propiedad se creía indeseable pero algunos estudios sugieren que este fenómeno puede hacer que la dosimetría de la luz utilizada sea menos crítica [12].
4. Bajo rendimiento cuántico para la generación de ROS tras la irradiación [9]. Estudios han demostrado que la adición de átomos pesados en la estructura del ICG puede aumentar la producción de ROS pero, en cambio, podría reducir la emisión de fluorescencia [25].

Para la PDT antitumoral, el ICG es inyectado por vía intravenosa y se transporta en sangre para acumularse en el tumor. En este caso, el 98 % del ICG se une a las proteínas del suero mientras que el ICG no unido es eliminado rápidamente del sistema vascular a través del hígado [19]. Sin embargo, para la aPDT se lleva a cabo la administración local del PS en la zona infectada mediante aplicación tópica, administración de aerosoles, inyección intersticial o instilación dependiendo de la localización de la infección [2].

La estructura química del ICG se muestra en la Figura 1.2. El ICG posee dos partes policíclicas, que contribuyen a una alta lipofilia (marcado en rojo con línea punteada en la figura), y un grupo sulfato conectado a cada anillo policíclico, que contribuye a sus propiedades hidrofílicas (marcado en azul con línea continua en la figura) [26]. Esta propiedad anfífilica le permite al ICG una mayor solubilidad en fluidos fisiológicos y una mayor biodisponibilidad [14].

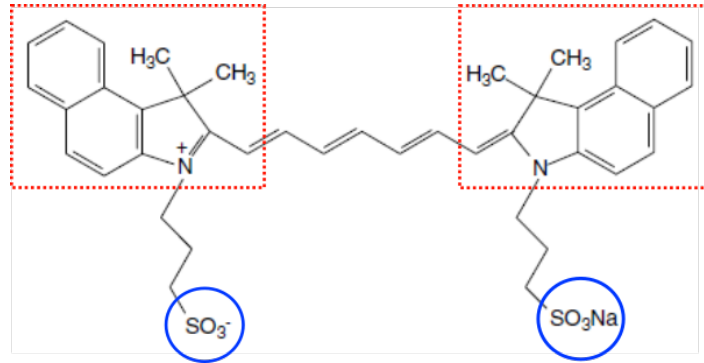


Figura 1.2: Estructura química del ICG [24].

1.2.2 Fuente de luz

En aPDT se utiliza luz láser de baja potencia que produce energía en el rango del ultravioleta (200-400 nm), del visible (400-700 nm) o en el rango del NIR (700-1200 nm) para activar al PS [3, 17]. Actualmente, las fuentes de luz utilizadas en aPDT son los láseres de Helio-Neón (633 nm), láseres de diodo de arseniuro de galio-aluminio (655 nm y 830 nm) y láseres de argón (488 nm y 514 nm) [17]. Otra alternativa como fuente de luz son los LEDs, capaces de producir alta intensidad de banda de amplio espectro. El láser tiene ventajas frente a los LEDs, como la mayor penetración de la luz en el tejido y mayor coherencia en el haz de luz. En cambio, los LEDs tienen un bajo coste y gran versatilidad, además de la capacidad de irradiar grandes áreas [3, 17]. En este caso se utilizará un láser diodo de 808 nm. La región láser utilizada se encuentra en el rango del NIR, lo cual es una ventaja ya que permite una mayor profundidad de penetración de la luz en los tejidos biológicos. Por lo que con este tipo de terapia sería posible tratar infecciones más profundas [27].

1.2.3 Oxígeno molecular

El oxígeno molecular presente en el tejido es necesario para producir ROS. A continuación se muestra el mecanismo de la generación de ROS mediante la aPDT (ver Figura 1.3) [6]. Tras la irradiación de luz, el PS absorbe el fotón pasando de un estado singlete fundamental (S_0) a un estado singlete excitado (S_n). Como este estado excitado es inestable, el PS puede perder esa energía ya sea emitiendo fluorescencia (F) o calor (H) de vuelta al estado fundamental. Otra opción es que el PS vaya del estado singlete excitado a otro estado triplete excitado (T_1) más estable (conocido como cruce inter-sistema o ISC). Una vez en este estado triplete, el PS puede volver al estado singlete fundamental o bien emitiendo fosforescencia (P) o generando ROS [11]. La aPDT se centra en este último caso. Existen dos tipos de mecanismos por los que se generan ROS:

- Tipo I: transferencia de electrones del PS excitado al oxígeno molecular presente en el ambiente generando ROS como radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilo (HO^*) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), responsables del efecto citotóxico
- Tipo II: transferencia directa de energía del PS excitado a un oxígeno molecular del estado fundamental formando un oxígeno singlete (1O_2)

Se cree que ambas reacciones participan en la aPDT pero normalmente una de ellas es predominante, lo cual depende de cada PS [28]. Tras un ciclo de generación de ROS, el PS está de nuevo en el estado singlete fundamental y puede llegar a absorber otro fotón generando más ROS. Se ha demostrado que un PS puede generar miles de moléculas de $^1\text{O}_2$ antes de ser destruido por fotoblanqueo [9]. El sitio de acción del PS depende de la localización del mismo y de la longitud de difusión de las ROS generadas. Debido al corto tiempo de vida de las ROS generadas, su longitud de difusión será corta, por lo que el daño oxidativo tendrá lugar en las cercanías del PS [6, 12].

Se ha determinado que las bacterias son capaces de adaptarse a las ROS generadas de tipo I pero, en cambio, no presentan mecanismos de defensa contra el $^1\text{O}_2$, por lo que éste podría ser el principal responsable de la inactivación de los microorganismos [6].

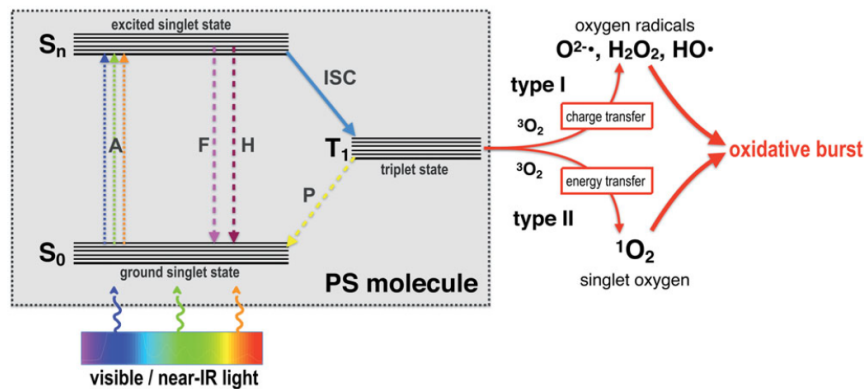


Figura 1.3: Diagrama de Jablonky: mecanismos de la generación de ROS en aPDT [11].

Cabe destacar que la inactivación de los microorganismos depende de ciertos factores como la concentración del ICG, la dosis de luz, el tiempo de irradiación, tiempo de incubación antes de irradiar, *etc* [29].

1.3 ¿Por qué el uso de nanopartículas?

Para superar las limitaciones que presenta el ICG, se han propuesto diferentes alternativas basadas en la nanotecnología [14]. Se ha demostrado que la encapsulación del ICG en diversos polímeros biodegradables ofrece enormes ventajas a las moléculas de ICG, como la mejora de su vida media, una mayor estabilidad, mayor biodisponibilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, reducción de la rápida degradación que sufre el ICG libre y la prevención de la agregación no deseada, entre otras [20, 14]. Sin embargo, la naturaleza anfífilica del ICG es uno de los principales obstáculos en la formulación de NPs de PLGA conteniéndolo [30]. La ventaja de encapsularlo en NPs frente a micropartículas radica en la elevada relación superficie-volumen de las primeras, que permitiría recubrir una mayor superficie y una liberación más rápida [26].

Se han utilizado varios polímeros para encapsular ICG, como el ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), el poli(etilenglicol) (PEG), policaprolactona (PCL) y el ácido poliláctico (PLA) [31]. En este caso se ha utilizado el PLGA, uno de los polímeros preferidos para aplicaciones biomédicas debido a sus atractivas propiedades como la biodegradabilidad, biocompatibilidad e hidrofobicidad [32]. El PLGA ha sido aprobado por la FDA como material de fabricación de muchos dispositivos médicos y se ha utilizado en humanos durante muchos años como material de sutura biodegradable [33].

Una de las ventajas de la utilización de este polímero es que existen formulaciones y métodos de síntesis bien descritos y adaptados a la encapsulación de diversos tipos de fármacos y PSs tanto hidrofílicos como hidrófobos. El PLGA se degrada gradualmente por hidrólisis en condiciones fisiológicas normales dando lugar a dos productos biocompatibles: ácido láctico y ácido glicólico. Este hecho hace que el polímero produzca una liberación del fármaco sostenida en el tiempo que depende del ratio láctico/glicólico y del peso molecular del copolímero [31, 14].

También se han utilizado NPs inorgánicas para encapsular el ICG, como nanorods de oro o sílice mesoporosa, o NPs basadas en carbono como el óxido de grafeno o liposomas. Sin embargo, estos sistemas presentan bajas tasas de biodegradación y un riesgo de bioseguridad en el campo biomédico, lo que limita su aplicación en este campo. [14].

1.4 Metodología

Se han utilizado varios procesos de encapsulación para proteger moléculas activas. Algunas de las técnicas de síntesis de NPs de PLGA más utilizadas son emulsión simple y doble con evaporación del disolvente, nanoprecipitación, salting out, electrospinning en reactores convencionales discontinuos (por lotes) o bien llevando a cabo dichas reacciones en reactores continuos como los reactores microfluídicos [34]. La selección de un método que proporcione una encapsulación adecuada depende de las propiedades fisicoquímicas del fármaco a encapsular, como su hidrofilia o hidrofobia, de los surfactantes usados, los disolventes, la concentración, *etc* [30, 35].

Para la obtención de NPs de PLGA-ICG se han llevado a cabo dos métodos de síntesis: síntesis en discontinuo (emulsión simple y doble con evaporación del disolvente mediante un transductor de ultrasonidos) y síntesis en continuo (emulsión simple y doble con evaporación del disolvente mediante el micromezclado de fases por tecnología microfluídica).

Debido a la naturaleza anfifílica del ICG es posible encapsular este PS tanto por emulsión simple (*Oil in Water*, O/W) como por emulsión doble (*Water in Oil in Water*, W/O/W). El proceso de emulsión con evaporación del disolvente mediante el uso de ultrasonidos se basa en la presencia de dos fases inmiscibles (agua y acetato de etilo) que se mezclan debido a la energía proporcionada por una sonda piezoeléctrica que genera ultrasonidos. Esta sonda piezoeléctrica facilita la formación de micelas que alojan en su interior al polímero disuelto en el disolvente orgánico. Posteriormente, se produce la evaporación por agitación del disolvente orgánico y la posterior precipitación del polímero encapsulando ICG, al no ser el polímero soluble en la fase acuosa [33]. La diferencia entre ambos procesos de emulsión está en la fase en la que se disuelve el PS. La emulsión O/W, cuya fase interna es orgánica, es adecuada para encapsular moléculas hidrófobas mientras que la emulsión W/O/W, cuya fase interna es acuosa, tiene la capacidad de encapsular fármacos tanto hidrófobos como hidrofílicos, lo que le da una gran ventaja frente a la emulsión O/W [31]. En la emulsión O/W el ICG se encapsula en la parte más interna de la partícula, en la fase orgánica, al igual que el PLGA mientras que en la emulsión W/O/W el ICG se encapsula en la fase acuosa más interna de la partícula. Ambas técnicas necesitan la presencia de un surfactante para conseguir una estabilidad de la emulsión a largo plazo y, de esta forma, favorecer el control del tamaño de las micelas formadas, que posteriormente se relaciona con

el tamaño final de las NPs generadas. Estas moléculas de surfactante migran a la interfaz líquido-líquido impidiendo la unión de las micelas. El proceso de emulsión con evaporación del disolvente es una de las técnicas de producción de NPs con el mayor control de tamaño que se puede alcanzar y es capaz de producir eficazmente partículas de escala nanométrica. Sin embargo, estas técnicas no son adecuadas para la producción a gran escala ya que, si se tratan volúmenes grandes de disolventes orgánicos, la sonda de ultrasonidos no genera ondas ultrasónicas de forma homogénea en toda la disolución, lo que da lugar a una polidispersidad de las NPs [36]. Además, existe un riesgo de contaminación de la muestra al someterla a la sonda de ultrasonidos ya que ésta puede emitir iones metálicos o partículas, consecuencia de los fenómenos de cavitación producidos en la superficie de la sonda [32]. En la Figura 1.4 se muestra un esquema representativo del proceso de síntesis por emulsión con evaporación del disolvente en discontinuo.

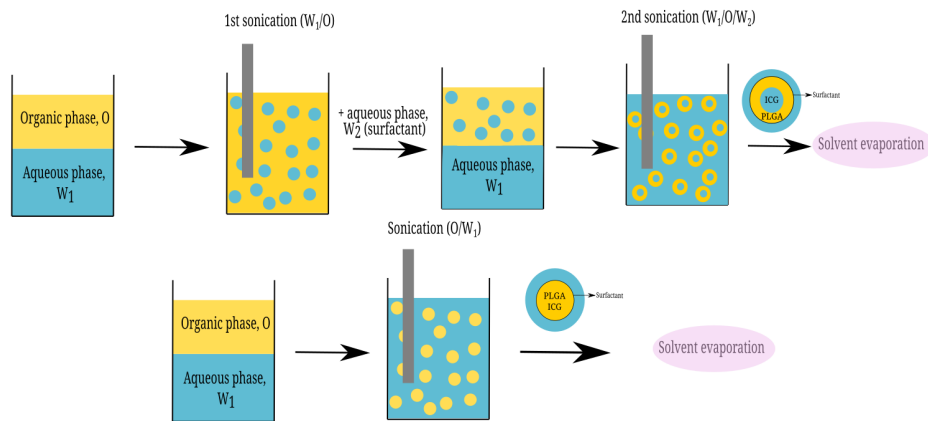


Figura 1.4: Imágenes representativas del proceso de emulsión-evaporación del disolvente O/W (abajo en la figura) y W/O/W (arriba en la figura). Imágenes modificadas de [37].

Para superar estas limitaciones se ha llevado a cabo una técnica de emulsión con evaporación del disolvente simple y doble mediante el micromezclado de fases por tecnología microfluídica (O/W-MF y W/O/W-MF respectivamente). Esta técnica permite dispersar dos fases inmiscibles al mismo nivel de mezclado que las ondas ultrasónicas. La elevada tensión de cizallamiento que se crea en los microcanales permite deformar y romper las micelas grandes en otras más pequeñas. Las pequeñas dimensiones que presentan los canales microfluídicos conducen a una relación superficie-volumen elevada, por lo que este método permite un control preciso de las condiciones de reacción, como el tiempo de reacción, de residencia, temperatura, concentración de reactivos, *etc.* Debido a esto, se consigue reducir la polidispersidad de las NPs resultantes comparadas con las obtenidas con el método tradicional discontinuo [32]. Este método también permite controlar el tamaño de las micelas que se generan a través de los microcanales mediante el ajuste de parámetros como la formulación de la emulsión, humectabilidad del canal y geometría del sistema. Con este método se conseguiría mejorar la reproducibilidad de la síntesis, el rendimiento y la cantidad producida de las NPs. En la Figura 1.5 se muestra un esquema representativo del proceso de síntesis de emulsión en continuo.

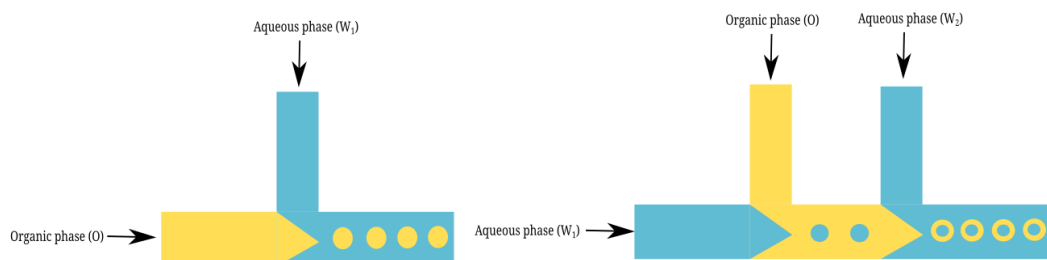


Figura 1.5: Imágenes representativas del proceso de emulsión con evaporación del disolvente O/W-MF (izquierda) y W/O/W-MF (derecha). Imágenes modificadas de [38].

1.5 Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es la síntesis de NPs de PLGA como vectores terapéuticos que encapsulen ICG por dos métodos de síntesis: emulsión- evaporación en discontinuo mediante el uso de ultrasonidos (O/W y W/O/W) y emulsión- evaporación en continuo mediante el micromezclado de fases por tecnología microfluídica (O/W-MF y W/O/W-MF). Se comparará la eficiencia de encapsulación (EE) así como la carga de PS (del anglicismo *drug loading* DL) obtenida para ambos métodos y, posteriormente, se probará la eficacia del compuesto *in vitro* contra infecciones causadas por *S. aureus* mediante aPDT.

Las NPs obtenidas por la técnica considerada como la óptima en este trabajo se caracterizarán por dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis), espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y potencial Z.

Además, se realizará un estudio de estabilidad para comprobar si el hecho de encapsular ICG en NPs de PLGA supera las limitaciones que tiene este PS libre, como la inestabilidad en solución acuosa y su rápida degradación inducida por la luz y la temperatura. También se realizará un estudio de liberación del ICG desde la matriz polimérica una vez encapsulado. Otro objetivo es cuantificar las ROS generadas por el ICG libre y encapsulado y evaluar la potencial actividad fototérmica de las NPs sintetizadas para determinar el aumento de temperatura tras la irradiación.

1.6 Estructura de la memoria

En el Capítulo 2 se enumeran los reactivos y materiales utilizados en los experimentos. También se describen las técnicas utilizadas para la caracterización de las NPs así como las técnicas utilizadas para la evaluación de la actividad fototérmica, fotodinámica y antimicrobiana. En los Anexos A y B se describen los protocolos y procedimientos seguidos para la síntesis de NPs y preparación de muestras, respectivamente, para los experimentos que se muestran en el Capítulo 2. En el Capítulo 3 se muestran los resultados y la discusión para cada experimento realizado, mostrándose en el Anexo C los resultados menos relevantes. Por último, en el Capítulo 4 se resumen las conclusiones obtenidas en el trabajo. En el Anexo D se muestra el diagrama de Gantt, donde se expone el tiempo dedicado para cada experimento y para las distintas fases del proyecto.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Equipos y reactivos

Los equipos utilizados fueron una microbalanza de precisión RADWAG MYA 5/2Y, un sonicador BRANSON Digital (North Olmsted, OH, USA), una placa agitadora de movimiento magnético 2MAG, una centrífuga *Heraeus Megafuge 16R* (*Thermo Scientific*), un espectrómetro de UV-Vis JASCO V-670, un equipo de analizador de tamaño de partícula 90Plus (*Brookhaven Instruments Corporation, BIC*), un equipo de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (VERTEX 70, Bruker), un baño de ultrasonidos (*Digital Ultrasonic Cleaner*), una microcentrífuga (*Spectrafuge 24D Labnet International*), un láser diodo ($6 \times 8 \text{ mm}^2$ spot; MDL-III-808-2W, *Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd., Changchun, China*), un lector de microplacas *Multimode Synergy HT* (*Biotek, WI, USA*), un microscopio electrónico de barrido *Inspect F50 field emission gun*, un microscopio electrónico de transmisión *T20-FEI Tecnai* operando a un voltaje de aceleración de 200 kV, bomba de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), micromezclador interdigital basado en PEEK (Micro4 Industries GmbH, Mainz, Alemania).

Los reactivos utilizados fueron PLGA resomer RG 504 25G (Germany), surfactante Pluronic F-68 (*Sigma Life Science*), acetato de etilo 99.6% ACS (*Acros organics*), verde de indocianina (*USP reference standard*), agua Milli-Q Millipore Q-POD, colato de sodio hidratado 99% (*Alfa Aesar*), *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Magnesium w/o Calcium* (*biowest*), *bovine serum albumin* o BSA (*Sigma Life Science*), dimetilsulfóxido ACS, $\geq 99.9\%$ (*sigma aldrich*), *Trypticasein Soy Broth* (TSB, *Condalab*), *Trypticasein Soy Agar* (TSA, *Condalab*) y *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG, *Thermo Fischer*).

2.2 Síntesis de nanopartículas

2.2.1 Síntesis en discontinuo: emulsión-evaporación simple y doble mediante el uso de ultrasonidos

En el Anexo A.1 se describe el protocolo correspondiente a la síntesis mediante emulsión con evaporación del disolvente O/W y W/O/W mediante el uso de ultrasonidos. Se realizó un proceso de optimización de lavado con el objetivo de recuperar el máximo número de NPs y evitar que éstas se queden en el sobrenadante, donde se recogen

los restos de polímero no emulsionados y el ICG no encapsulado (Anexo A.1.1). Si el proceso de producción se hace de forma eficiente, el sobrenadante no suele tener un valor material elevado para poder ser recuperado y generalmente se desecha. Por este motivo es necesario estudiar las mejores condiciones de purificación.

También se optimizó el parámetro de la concentración de ICG. El objetivo del proceso de optimización de este parámetro es obtener la concentración óptima de ICG para la cual se obtiene una mayor cantidad de ICG encapsulada pero que no sea lo suficientemente elevada como para que se produzca una desactivación de la fluorescencia (*quenching*) que pueda afectar a las propiedades fotodinámicas (generación de ROS). Una vez optimizado el proceso de lavado y, manteniendo la cantidad de polímero constante, se probaron distintas cantidades de ICG para ambos métodos de emulsión con el objetivo de determinar la cantidad óptima para la cual se obtiene el máximo DL y la máxima EE. Estas cantidades de ICG fueron 0.625 mg y 1.3 mg de ICG por 50 mg de PLGA para la emulsión O/W mientras que para la emulsión W/O/W se probaron 0.625 mg y 1 mg de ICG por 50 mg de PLGA. El ICG tiene un límite de solubilidad en agua de 1 mg/mL, medio en el que es necesario disolver el ICG para llevar a cabo el proceso de emulsión W/O/W. Sin embargo, la solubilidad del ICG en DMSO es de 30 mg/mL, disolvente soluble en acetato de etilo necesario para solubilizar el ICG para llevar a cabo la emulsión O/W. Por esta razón, no se probaron cantidades de ICG mayores de 1 mg para la emulsión W/O/W, ya que el PS ha de disolverse en 1 mL de agua. Se realizaron, al menos, tres réplicas para cada caso y se llevó a cabo un análisis estadístico. Para ambos métodos también se prepararon NPs de PLGA vacías como control (sin ICG).

2.2.2 Síntesis en continuo: emulsión- evaporación simple y doble mediante tecnología microfluídica

Se prepararon NPs de PLGA-ICG mediante el proceso de emulsión con evaporación del disolvente O/W-MF y W/O/W-MF manteniendo las mismas proporciones de los reactivos que en el caso del método en discontinuo. Se utilizó la cantidad de ICG óptima para la cual se obtuvo la mayor carga de ICG en el método de emulsión en discontinuo. En el Anexo A.2 se describe el protocolo seguido para el proceso de emulsión- evaporación O/W-MF y W/O/W-MF. Este proceso de síntesis se realizó por triplicado y se llevó a cabo un análisis estadístico.

2.3 Determinación de la carga de fármaco, eficiencia de encapsulación y balance de materia

El DL indica la cantidad de PS que se ha encapsulado con respecto a la cantidad total de NPs obtenidas [39]. Este parámetro se puede determinar mediante el método directo o indirecto. A continuación se observan las ecuaciones utilizadas para determinar el DL:

$$DL_{\text{teórico}}[\%] = \frac{\text{ICG inicial}}{\text{PLGA inicial} + \text{ICG inicial}} \times 100 \quad (2.1)$$

$$DL_{\text{exp. directo}}[\%] = \frac{\text{ICG encapsulado}}{\text{NPs final}} \times 100 \quad (2.2)$$

$$DL_{\text{exp. indirecto}}[\%] = \frac{\text{ICG inicial} - \text{ICG sobrenadante}}{\text{NPs final}} \times 100 \quad (2.3)$$

La concentración final de las NPs se determinó añadiendo 20 μL de la disolución de las NPs en unos pocillos que han sido pesados vacíos previamente. Estos pocillos se introdujeron en una estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas aproximadamente, transcurridas las cuales se pesaron los pocillos con las NPs secas, obteniendo la concentración final de NPs PLGA-ICG (Ecuación 2.4).

$$\text{NPs final} [\text{mg/mL}] = \frac{\text{Pocillos NPs} [\text{mg}] - \text{Pocillos vacíos} [\text{mg}]}{0.02 [\text{mL}]} \quad (2.4)$$

Para el **DL teórico** la cantidad de ICG encapsulada es la misma que la cantidad de ICG añadida inicialmente (Ecuación 2.1). El ICG encapsulado ha sido determinado experimentalmente tanto por el método directo como por el método indirecto con el objetivo de tener una mayor fiabilidad en los resultados obtenidos. En el caso del **DL exp. directo** (Ecuación 2.2) se ha determinado la concentración de ICG encapsulada a partir del máximo de absorbancia del PS mediante un espectrofotómetro UV-Vis. Las NPs obtenidas (redispersadas en una cierta cantidad de H_2O Milli-Q) se disolvieron en una cantidad de DMSO, disolvente capaz de disolver el PLGA, cuyo objetivo es disolver las NPs y permitir salir al ICG de su interior para poder ser medido cuantitativamente de forma directa. Una vez medido el máximo de absorbancia, se obtuvo la concentración de ICG encapsulada mediante una recta de calibrado en el disolvente usado (i.e. $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$). En el Anexo B.1 se muestran las curvas de calibrado utilizadas para calcular la concentración de ICG encapsulada y la concentración de ICG presente en el sobrenadante.

Para calcular el **DL exp. indirecto** (Ecuación 2.3) se determinó la concentración de ICG presente en el sobrenadante (ICG no encapsulado). La diferencia entre la cantidad de ICG añadida inicialmente y la cantidad de ICG en el sobrenadante debería ser la cantidad de ICG encapsulada. Se disolvió un determinado volumen de sobrenadante en H_2O Milli-Q para medir el espectro de absorbancia del ICG no encapsulado. La concentración de ICG no encapsulada se calculó a partir de una curva de calibrado utilizando H_2O Milli-Q como disolvente (Anexo B.1).

La **EE** indica la cantidad de ICG encapsulada con respecto a la cantidad de ICG inicial (Ecuación 2.5) [39]. También se realizó un balance de materia para calcular el **error** del proceso. Para que no haya error en el proceso, la cantidad de ICG no encapsulada junto con la cantidad de ICG encapsulada debería ser igual a la cantidad de ICG añadida inicialmente (Ecuación 2.6). Por último se calculó el **rendimiento** de la síntesis con la Ecuación 2.7, que indica la masa final de las NPs respecto a la masa total añadida inicialmente de PLGA e ICG.

$$EE[\%] = \frac{\text{ICG encapsulado}}{\text{ICG inicial}} \times 100 \quad (2.5)$$

$$\text{Error}[\%] = \frac{\text{ICG inicial} - (\text{ICG encapsulado} + \text{ICG sobrenadante})}{\text{ICG inicial}} \times 100 \quad (2.6)$$

$$\text{Rendimiento}[\%] = \frac{\text{NPs final}}{\text{ICG inicial} + \text{PLGA inicial}} \times 100 \quad (2.7)$$

2.4 Espectroscopía ultravioleta-visible, UV-vis

El ICG encapsulado y el ICG presente en el sobrenadante se cuantificaron por medio de un espectrofotómetro de ultravioleta-visible JASCO V-670 en el rango de longitud de onda de 600- 900 nm. A partir del máximo de absorbancia del ICG y la curva de calibrado correspondiente se determinó la concentración de ICG encapsulado en las NPs. En el Anexo B.2 se describe brevemente la preparación de las muestras para su posterior medida.

2.5 Caracterización de las NPs

En el Anexo B.3 se describen los protocolos seguidos para la preparación de las muestras de NPs para su posterior caracterización.

2.5.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Se utilizó el método de dispersión dinámica de la luz (DLS) para determinar el tamaño de las NPs en dispersión acuosa utilizando el software *Brookhaven Instruments Corporation* (BIC) *Particle Sizing*. Se determinó el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad de las NPs de PLGA-ICG obtenidas por la técnica más adecuada y las NPs de PLGA control. El tamaño hidrodinámico de las NPs se refiere a su diámetro en disolución acuosa junto con su esfera de solvatación. Por otra parte, el índice de polidispersidad indica la heterogeneidad de las NPs basada en el tamaño. Valores cercanos a 0 indican que las NPs son monodispersas mientras que valores cercanos a la unidad indican que las NPs son altamente polidispersas. Cada medida se realizó por triplicado y se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente.

2.5.2 Potencial zeta

Se determinó el potencial zeta de las NPs utilizando el software BIC (*Brookhaven Instruments Corporation*) *PALS zeta potential analyzer*. El potencial zeta indica la carga superficial de las NPs. Se midió el potencial zeta para las NPs de PLGA-ICG y NPs de PLGA en dispersión acuosa a pH 7.

Cada medida se realizó por triplicado y se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente.

2.5.3 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó la espectroscopía de infrarrojos para determinar los enlaces químicos presentes con el fin de analizar la composición química de la estructura del ICG libre, de las NPs de PLGA vacías y las NPs de PLGA-ICG obtenidas por la técnica considerada como la óptima así como de las interacciones entre ellas. Para la medida se utilizó un espectrómetro de modelo VERTEX 70 Bruker.

2.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las NPs se visualizaron mediante un microscopio electrónico de barrido (Inspect F50 *field emission gun*). Se determinó el diámetro de las NPs, la distribución de tamaño y la morfología superficial de las mismas. Se visualizó la imagen por SEM de 2 réplicas de las NPs de PLGA-ICG obtenidas por la técnica considerada más óptima. También se visualizó por SEM una imagen de las NPs de PLGA control (no cargadas de ICG). A partir de las imágenes obtenidas por SEM, la distribución del tamaño se determinó midiendo el diámetro de 150 NPs mediante el software de acceso libre ImageJ.

2.5.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las NPs de PLGA-ICG se visualizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM) T20-FEI Tecnai *thermionic microscope* (voltaje de aceleración de 200 kV) para observar el diámetro y morfología de las NPs. Esta técnica de caracterización tiene una mayor resolución espacial que el SEM y permite estudiar la estructura interna de las NPs generadas. A partir de las imágenes obtenidas por TEM, la distribución del tamaño se determinó midiendo el diámetro de 150 NPs mediante el software de acceso libre ImageJ.

2.6 Estudio de estabilidad de las NPs de PLGA-ICG y del ICG libre

Se realizó el estudio de estabilidad tanto de las NPs PLGA-ICG como del ICG libre a 4 °C y a 37 °C a lo largo de 8 días (a las 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h y 192 h). Se probaron dos concentraciones de ICG (100 ppm y 50 ppm) para analizar el efecto de la concentración en la estabilidad del ICG libre y de las NPs de PLGA-ICG. En el Anexo B.4 se describe el procedimiento llevado a cabo para el estudio de estabilidad. A partir de la medida de absorbancia del ICG y, siguiendo la Ecuación 2.8, se calculó el porcentaje de degradación de ICG para cada caso.

$$\text{ICG degradado}_{t=x} [\%] = \frac{\text{Abs}_{t=x} - \text{Abs}_{t=0}}{\text{Abs}_{t=0}} \times 100 \quad (2.8)$$

2.7 Estudio de liberación del ICG de las NPs

El estudio de liberación del ICG de las NPs se realizó en el tampón fosfato salino (PBS, pH = 7.4) y en H₂O Milli-Q (pH=7). Este estudio se llevó a cabo a 37 °C en un periodo de 8 días. Se midieron las muestras a las 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h y 192 h. Debido a que las NPs de PLGA-ICG tienden a agregarse en medio salino (como en PBS) [22] se les añadió un agente estabilizante, en este caso albúmina de suero bovina (BSA). Se trataba de evaluar la actividad antimicrobiana de estas NPs de PLGA-ICG-BSA. Se realizó el estudio de liberación en PBS con el estabilizador añadido para estudiar el efecto de éste en la liberación de ICG. En el Anexo B.5 se describe el procedimiento para la preparación de muestras para el estudio de liberación.

Debido a la degradación lumínica y térmica que sufre el ICG libre en medio acuoso, no es posible medir de forma directa el ICG que se ha liberado en el sobrenadante. Algunos estudios han demostrado que la encapsulación del ICG en NPs poliméricas

detiene o reduce la degradación del ICG [24]. Por ello, se midió la absorbancia del ICG que quedaba encapsulado en las NPs después de un determinado tiempo. El ICG liberado en el sobrenadante se calculó siguiendo la Ecuación 2.9. El porcentaje de ICG liberado en cada punto $t = x$ se calculó siguiendo la Ecuación 2.10.

$$\text{ICG sobrenadante [ppm]} = \text{ICG inicial [ppm]} - \text{ICG encapsulado [ppm]} \quad (2.9)$$

$$\text{ICG liberado [\%]}_{t=x} = \frac{\text{ICG sobrenadante}_{t=x} - \text{ICG sobrenadante}_{t=0}}{\text{ICG sobrenadante}_{t=0}} \times 100 \quad (2.10)$$

Para el estudio de la cinética de liberación se realizaron varios ajustes matemáticos: de orden 1, y los propuestos por Higuchi, Korsmeyer Peppas, Lindner Lippold y Peppas Sahlin. Estos ajustes matemáticos se realizaron únicamente para la cinética de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA ya que la evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo con las mismas.

2.8 Cuantificación de ROS

Se cuantificaron las ROS mediante fluorescencia, el método más común para detectar estas especies. Las ROS pueden reaccionar con diferentes sondas químicas dando productos luminiscentes, los cuales están relacionados con la concentración de ROS [40, 41]. En este caso, se utilizó una sonda fluorescente de oxígeno singlete (*Singlet Oxygen Sensor Green*, SOSG) para la detección específica del $^1\text{O}_2$. Esta sonda ha mostrado una fuerte especificidad hacia el $^1\text{O}_2$ frente a otras ROS [40]. La sonda SOSG muestra inicialmente una débil fluorescencia azul. Cuando se irradia con luz en el rango del NIR la sonda SOSG reacciona con el $^1\text{O}_2$ para formar un endoperóxido. Este endoperóxido presenta una fluorescencia verde con picos de excitación y emisión de 504 y 525 nm respectivamente [40, 42]. Esta reacción de la sonda SOSG con el $^1\text{O}_2$ para formar el endoperóxido se muestra en la Figura 2.1.

En el Anexo B.6 se describe el procedimiento realizado para la cuantificación de ROS. Se utilizaron las mismas condiciones de irradiación y las mismas concentraciones de ICG que se utilizaron para evaluar la actividad antimicrobiana.

2.9 Actividad fototérmica

Se evaluó la actividad fototérmica del ICG libre y encapsulado mediante la técnica de síntesis más óptima. Se determinó el aumento de la temperatura debido a la irradiación láser para el ICG libre y encapsulado con una concentración de ICG de 25 ppm. En el Anexo B.7 se describe el procedimiento llevado a cabo para la evaluación de la actividad fototérmica.

2.10 Actividad antimicrobiana

Para llevar a cabo los ensayos microbiológicos se evaluaron distintos parámetros: concentración del ICG (25 ppm, 50 ppm y 100 ppm) y el tiempo de incubación antes de

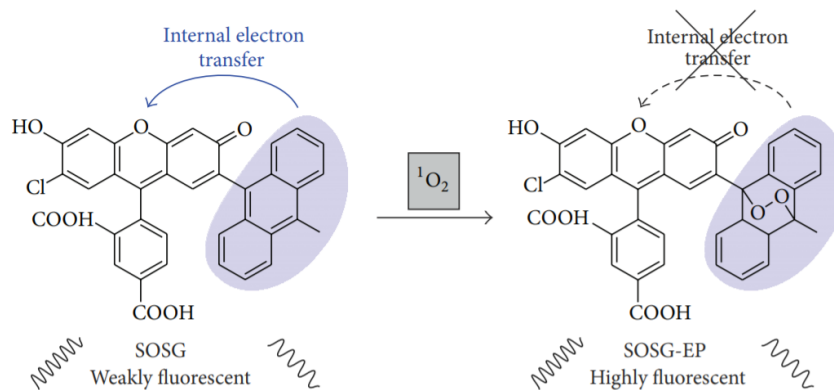


Figura 2.1: Formación del endoperóxido de SOSG tras la reacción de la sonda SOSG con el $^1\text{O}_2$ como método indirecto para la detección de $^1\text{O}_2$. Antes de la reacción con $^1\text{O}_2$, la transferencia de electrones interna desactiva la fluorescencia de la sonda. Tras la reacción con el $^1\text{O}_2$ y la formación del endoperóxido no se da el proceso de transferencia de electrones interna observándose una fuerte fluorescencia [43].

irradiar (15 min y 24 h). Los distintos ensayos microbiológicos se realizaron tanto para el ICG libre como para el ICG encapsulado en las NPs obtenidas por la técnica más óptima. En el Anexo B.8 se describe el protocolo para cada experimento de esta sección. Se determinó la viabilidad bacteriana a partir de las CFUs/mL calculadas siguiendo la Ecuación 2.11. Cada experimento se realizó por triplicado para realizar el análisis estadístico correspondiente.

$$\text{CFUs/mL} = \frac{\text{Número de colonias}}{0.025 \text{ mL}} \times \text{factor de dilución} \quad (2.11)$$

2.11 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado para realizar la correspondiente estadística. Los datos obtenidos para los experimentos de actividad antimicrobiana fueron evaluados mediante el análisis estadístico ANOVA (*two-way ANOVA*, *Graphpad Prism 8*). Las diferencias entre los distintos experimentos fueron consideradas significativas si $p\text{valor} < 0.05$.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Determinación de la carga, eficiencia de encapsulación y balance de materia.

En esta sección se resumen los resultados más relevantes obtenidos en las distintas técnicas de síntesis con la concentración óptima de ICG para la cual se obtiene una mayor carga de ICG encapsulada en las NPs. En el Anexo C.1 se muestran los resultados obtenidos en las técnicas de emulsión O/W y W/O/W para distintas cantidades de ICG. Como se comenta en este anexo la cantidad óptima de ICG para obtener un mayor DL en el caso de la emulsión O/W es de 1.3 mg. Para la emulsión W/O/W es de 1 mg. En la Tabla 3.1 se muestran los resultados en porcentaje de DL, EE, rendimiento y error obtenidos para las NPs de PLGA-ICG sintetizadas por las distintas técnicas de síntesis con la cantidad de ICG óptima. La técnica de síntesis óptima para la cual se ha obtenido la mayor carga de fármaco es la emulsión W/O/W con 1 mg de ICG.

Técnica de síntesis	DL _{teórico} [%]	DL _{exp. directo} [%]	DL _{exp. indirecto} [%]	EE [%]	Error [%]	Rendimiento [%]
O/W 1.3mgICG	2.53	0.61 ± 0.08	1.56 ± 0.91	7.80 ± 1.17	19.39 ± 2.42	32.96 ± 1.61
O/W-MF 1.3mgICG	2.53	0.42 ± 0.02	6.13 ± 1.82	3.50 ± 1.15	68.05 ± 10.17	21.24 ± 7.47
W/O/W 1mgICG	1.96	0.85 ± 0.05	1.39 ± 0.26	17.14 ± 1.92	11.78 ± 5.64	40.37 ± 4.72
W/O/W-MF 1mgICG	1.96	0.61 ± 0.01	17.94 ± 9.09	3.30 ± 1.25	79.64 ± 5.89	10.64 ± 4.20

Tabla 3.1: Porcentaje del DL, EE, rendimiento y error en el caso de las NPs PLGA-ICG sintetizadas por distintas técnicas con la concentración óptima de ICG. O/W y W/O/W son las técnicas de emulsión simple y doble en discontinuo. O/W-MF y W/O/W-MF son las técnicas de emulsión simple y doble en continuo. MF significa reactor continuo microfluídico.

A la vista de los resultados, el mayor porcentaje de DL se obtuvo para la técnica de emulsión W/O/W con 1 mg de ICG. En el caso de la técnica de emulsión W/O/W, el DL fue mayor en el caso del método en discontinuo que en continuo (0.85 % y 0.61 % respectivamente). Se obtuvo la misma conclusión para el caso de la emulsión O/W. El DL calculado por el método indirecto es mayor en todos los casos y difiere del DL calculado por el método directo. El método indirecto parece menos fiable debido a que en él se supone que el ICG que no está presente en el sobrenadante es el que se encapsula, considerando además que no hay ninguna pérdida de ICG en el proceso de encapsulación. En las técnicas de emulsión O/W-MF y W/O/W-MF el DL determinado por el método indirecto es muy elevado, lo cual se debe a una gran pérdida de ICG durante el proceso de encapsulación, indicando un alto error en el balance de materia

y bajos rendimientos de síntesis. Esta pérdida de ICG se puede deber a que a que la mayoría de NPs podrían haber quedado retenidas en el sobrenadante durante el proceso de lavado. Por ello, sería necesario volver a optimizar el proceso de lavado para el método en continuo o centrifugar a una mayor velocidad para conseguir precipitar el máximo número de NPs posible.

La mayor EE se obtiene para la técnica de emulsión W/O/W. En ningún caso se obtuvo un alto DL y EE debido a que tanto el ICG como el PLGA tienen carga negativa, lo que produce una repulsión electrostática, disminuyendo así la incorporación del ICG en las NPs de PLGA. Para la emulsión O/W no se pudo conseguir un alto DL debido a la naturaleza anfifílica del ICG, puesto que el ICG puede difundir a la fase acuosa.

Comparando los métodos en discontinuo, para la emulsión W/O/W los rendimientos de síntesis son mayores debido a que las NPs obtenidas por esta técnica son de mayor tamaño y, por tanto, tiende a precipitar un mayor número de NPs en el proceso de lavado. Se obtuvo un mayor DL y EE en la emulsión W/O/W debido a que en este caso, el ICG se disuelve en agua mientras que en la emulsión O/W el ICG se disuelve en DMSO, el cual es miscible en agua y puede difundir a la fase externa junto con el ICG. Además, el DMSO no es volátil y no se consigue eliminar durante el proceso de evaporación. Solo se podría eliminar por sucesivas centrifugaciones reemplazando el sobrenadante por agua sin dañar el polímero ya que su punto de ebullición a 1 atm es de 189 °C.

Como conclusión, la técnica que se ha considerado óptima en este trabajo de investigación para llevar a cabo la encapsulación del ICG es la emulsión doble en discontinuo con 1 mg de ICG, por lo que las siguientes etapas del proceso se llevarán a cabo con las NPs obtenidas por esta técnica de síntesis. No obstante, a pesar de que los resultados obtenidos con el sistema de producción en continuo no permitieron igualar o mejorar aquellos obtenidos con el proceso en discontinuo, se considera que, tras la optimización del proceso de lavado, se podrían equiparar ambas técnicas. Este sería un dato muy relevante dado lo que implica la producción de un vector para aPDT en continuo.

3.2 Caracterización por espectrofotometría UV-vis

En la Figura 3.1 se muestra el espectro de absorbancia correspondiente al ICG libre presente en el sobrenadante y al ICG encapsulado en las NPs PLGA-ICG. Estudios han demostrado que la incorporación de ICG en NPs poliméricas hace que absorba y emita a una longitud de onda mayor que las moléculas de ICG libre [24]. En la Figura 3.1 se observa un desplazamiento en el máximo de absorbancia de 15 nm al encapsular el ICG en NPs. El ICG tiene un pico de absorbancia característico en la región del NIR, cuyo máximo se encuentra a 779 nm si el ICG está libre y a 794 nm si el ICG se encuentra encapsulado debido a las diferencias en las constantes dieléctricas del medio tras estar encapsulado.

El desplazamiento de la longitud de onda del espectro de absorción podría ser debido también a la formación de agregados moleculares de las moléculas de ICG estrechamente empaquetadas en NPs, que absorben a longitudes de onda mayores en comparación con las moléculas de ICG libre [24, 21]. Se ha reportado que este desplazamiento en la longitud de onda también se produce en función de algunos factores, como el pH [24], el disolvente en el que se encuentra el ICG, presencia de sales en el medio, o dimerización o polimerización del ICG a mayores concentraciones [8].

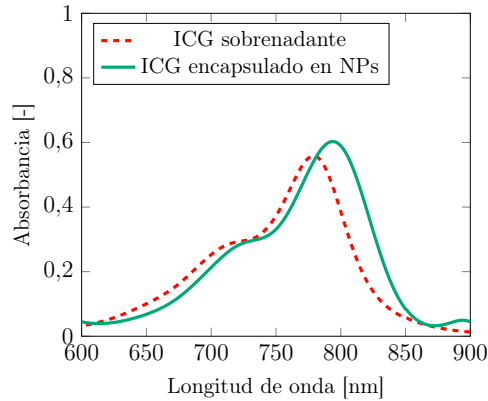


Figura 3.1: Desplazamiento en la longitud de onda del ICG libre y encapsulado.

3.3 Caracterización de las NPs

3.3.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

En la Tabla 3.2 se muestra el diámetro hidrodinámico y polidispersidad de las NPs de PLGA-ICG y NPs de PLGA vacías obtenidas por la técnica más óptima. Se obtuvieron NPs de PLGA-ICG con un diámetro hidrodinámico medio de 170.0 ± 47.0 nm y NPs de PLGA vacías con un diámetro medio de 179.8 ± 38.4 nm. Se demuestra que el hecho de encapsular ICG en las NPs de PLGA no altera el diámetro hidrodinámico medio. El índice de polidispersidad para las NPs de PLGA-ICG y NPs de PLGA vacías es de 0.077 ± 0.009 y 0.051 ± 0.021 , respectivamente. Esto indica que las NPs de PLGA vacías y las NPs de PLGA-ICG son monodispersas ya que los valores del índice de polidispersidad se encuentran cercanos a 0.

En el Anexo C.2.1 se muestran los valores del diámetro hidrodinámico y polidispersidad para las demás técnicas de síntesis. Como se muestra en el anexo se obtienen NPs de mayor tamaño mediante el método en continuo, así como también un mayor índice de polidispersidad. Esto difiere del fundamento teórico de esta técnica, que se basa en la obtención de NPs más monodispersas debido al mayor control en la síntesis. El hecho de obtener una mayor polidispersidad de NPs de PLGA-ICG obtenidas por el método de emulsión O/W-MF y W/O/W-MF puede ser debido a que en la síntesis de las NPs de PLGA-ICG se utilizaron unas condiciones de operación adaptadas para un proceso de síntesis sin ICG [32]. A la vista de los resultados, la presencia del ICG puede alterar las variables fluidodinámicas del sistema, haciendo necesario un estudio en profundidad que queda al margen de este TFM por cuestiones de tiempo.

También puede ser que con los caudales de las corrientes impuestos, el tiempo de residencia haya sido muy corto (10 ms). También puede ser debido a que no se haya alcanzado un control adecuado de la temperatura de emulsificación, ya que esta variable afecta a la viscosidad de los fluidos y es una variable crítica para el control del tamaño. Para conseguir una liberación sostenida en el tiempo y reproducible es necesario que las NPs sean monodispersas, haciendo que el método en discontinuo sea por este motivo el más adecuado.

	NP _s PLGA-ICG	NP _s PLGA
Diámetro hidrodinámico [nm]	170.0 ± 47.0	179.8 ± 38.4
Polidispersidad	0.077 ± 0.009	0.051 ± 0.021

Tabla 3.2: Diámetro hidrodinámico medio e índice de polidispersidad de las NP_s de PLGA-ICG y NP_s de PLGA vacías.

3.3.2 Potencial zeta

Como se observa en la Tabla 3.3 el potencial zeta de las NP_s de PLGA-ICG y NP_s de PLGA es -43.8 ± 6.27 mV y -47.16 ± 4.23 mV respectivamente. Estos valores de potencial zeta indican que las NP_s permanecen en suspensión y no tienden a aglomerarse en dispersión acuosa al tener una carga neta superior a los 30 mV. Estos valores también indican que la superficie de las NP_s está cargada negativamente debido a la presencia del surfactante (iones colato provenientes del colato sódico), que tiene carga negativa. El hecho de encapsular ICG en las NP_s poliméricas no altera de forma significativa el potencial zeta.

En el Anexo C.2.2 se muestran los resultados del potencial zeta para las demás técnicas de síntesis.

	NP _s PLGA-ICG	NP _s PLGA
Potencial zeta [mV]	-43.8 ± 6.27	-47.16 ± 4.23

Tabla 3.3: Potencial zeta obtenido para las NP_s de PLGA-ICG y NP_s de PLGA vacías.

3.3.3 FTIR

La caracterización de las NP_s por FTIR muestra los enlaces presentes en las moléculas de ICG libre, PLGA y NP_s de PLGA-ICG. Como se observa en la Figura 3.2 el espectro para el polímero y para las NP_s es idéntico. Como la carga de ICG en las NP_s es muy reducida (0.85 %) en el espectro no se observan los enlaces correspondientes a la molécula de ICG. Por tanto, esta técnica de caracterización no se considera adecuada para confirmar la carga de ICG en PLGA.

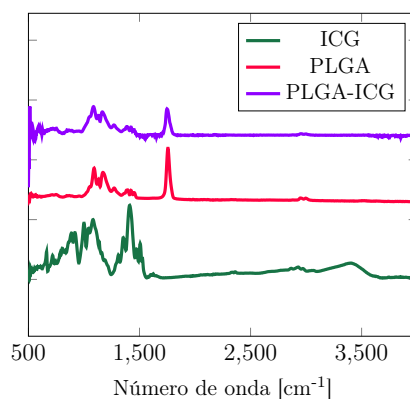


Figura 3.2: Caracterización por FTIR del ICG libre, PLGA y NP_s PLGA-ICG.

3.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 3.3a muestra una morfología esférica de las NPs de PLGA-ICG sintetizadas por W/O/W y una alta monodispersidad de las mismas. A partir de la imagen del SEM, se obtuvieron NPs con un diámetro medio de 136.7 ± 34.8 nm. Este diámetro medio obtenido a partir de la imagen del SEM es menor que el diámetro medio obtenido por las medidas del DLS. Esto se debe a que las NPs se contraen al estar en estado seco para el primer caso mientras que para las medidas del DLS las NPs se encuentran en medio acuoso, midiéndose las NPs junto con su esfera de solvatación.

En el Anexo C.2.3 se muestran las imágenes del SEM y la correspondiente gráfica de distribución de tamaño para las NPs de PLGA-ICG obtenidas mediante la técnica de emulsión en continuo, donde se observa una amplia distribución de tamaños y una alta polidispersidad en comparación con el método de síntesis en discontinuo, como ya se había deducido en la Sección 3.3.1. En el anexo también se muestran las imágenes del SEM para las NPs de PLGA vacías. Al cargar el ICG en la matriz polimérica no se observan cambios significativos en el diámetro medio (136.66 nm con ICG y 125.76 nm sin ICG), en la distribución de tamaño (34.86 nm con ICG y 38.6 nm sin ICG) ni en la morfología (esférica en ambos casos).

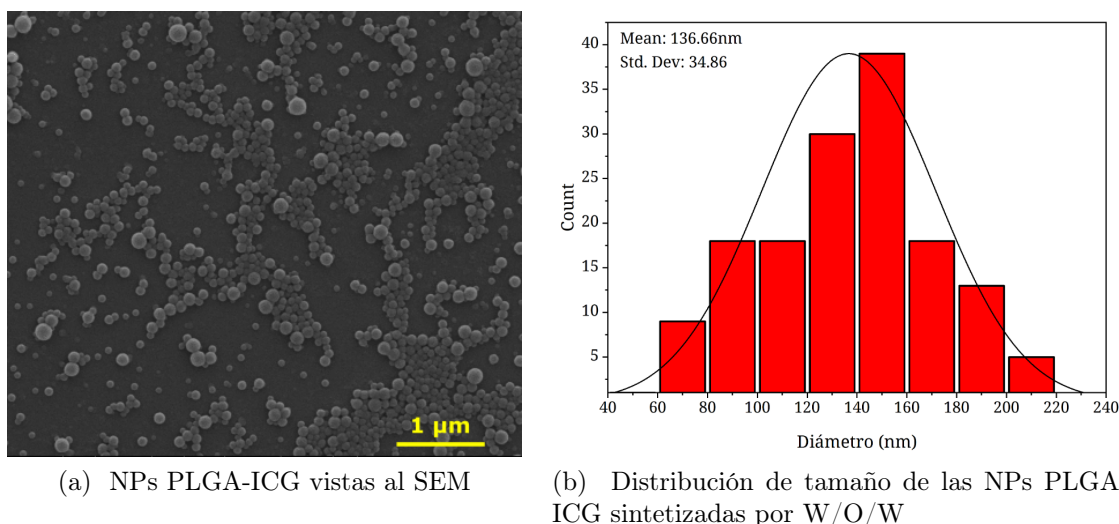
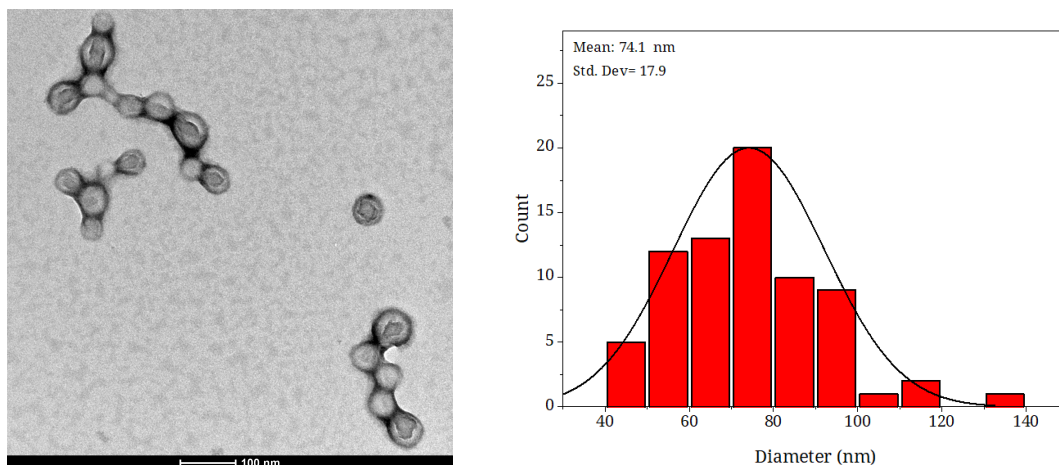


Figura 3.3: Imagen vista al SEM de las NPs PLGA-ICG obtenidas por W/O/W en discontinuo (a), y su distribución de tamaño correspondiente (b).

3.3.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes vistas al TEM (Figura 3.4) de las NPs muestran que las NPs son esféricas y de tamaño uniforme, tal y como se había demostrado en la sección anterior. El tamaño medio de las NPs obtenido a partir de la imagen de TEM es de 74.1 ± 17.9 nm. Tanto el diámetro medio de las NPs como su distribución de tamaño es significativamente menor en este caso frente a lo obtenido a partir de la imagen del SEM. La presión de vacío de la columna del microscopio es todavía mayor que la existente en el SEM. Por ello se produce un mayor colapso y por ende, una reducción mayor del tamaño. Por consiguiente, los datos obtenidos muestran la importancia de utilizar diferentes técnicas de medida del tamaño de las NPs. Por un lado técnicas macroscópicas como

el DLS, que permiten conocer el tamaño de la partículas en el medio de dispersión y con su máxima hidratación. Por otro lado las técnicas microscópicas, SEM y TEM, que permiten estudiar el grado de agregación de las NPs, aunque en un estado no hidratado.



(a) NPs PLGA-ICG vistas al TEM

(b) Distribución de tamaño obtenido a partir de la imagen del TEM de las NPs PLGA-ICG

Figura 3.4: Imagen vista al TEM de las NPs PLGA-ICG (a) y la distribución de tamaño obtenida a partir de la imagen del TEM (b).

3.4 Estudio de estabilidad de las NPs

En la Figura 3.5 se muestra el porcentaje de degradación que sufre tanto el ICG libre como el ICG encapsulado por W/O/W a distintas concentraciones (100 ppm y 50 ppm) y a distintas temperaturas (4 °C y 37 °C). Para el ICG libre se observa que a mayor temperatura mayor es la tasa de degradación del ICG. También se deduce que a mayor concentración de ICG la tasa de degradación es menor. Esta información es corroborada por otros estudios previos [21, 23]. En el caso del ICG encapsulado no hay tanta dependencia del porcentaje de degradación con la temperatura y concentración. Cabe destacar que encapsulando el ICG en NPs poliméricas se consigue reducir significativamente (o incluso eliminar) la rápida degradación que sufre el ICG libre.

Condición	% degradación ICG libre		% degradación NPs PLGA-ICG	
	A las 24 h	A los 7 días	A las 24h	A los 7 días
50 ppm, 4 °C	26.13 ± 10.76	54.32 ± 7.86	No detectado	1.60 ± 0.43
50 ppm, 37 °C	72.24 ± 3.01	98.06 ± 1.15	No detectado	16.11 ± 2.65
100 ppm, 4 °C	14.14 ± 8.78	42.25 ± 4.95	1.93 ± 1.72	4.07 ± 3.02
100 ppm, 37 °C	59.31 ± 6.92	87.48 ± 3.63	3.04 ± 1.14	12.84 ± 6.05

Tabla 3.4: Porcentaje de degradación del ICG libre y encapsulado a las 24h y 168h para distintas concentraciones y temperaturas.

En la Tabla 3.4 se muestran los valores del porcentaje de degradación para el ICG libre y encapsulado a las 24 horas y a los 7 días para las distintas concentraciones y temperaturas analizadas.

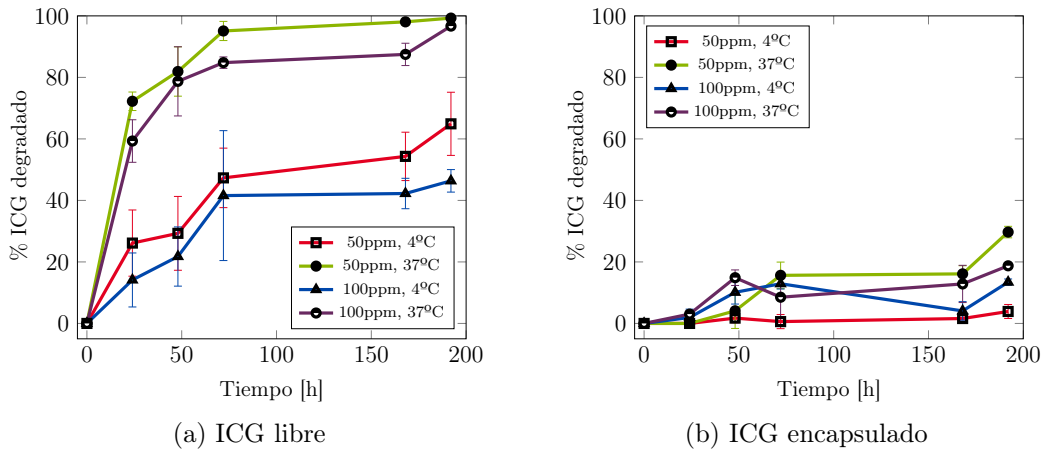


Figura 3.5: Porcentaje de degradación del ICG libre (a) y encapsulado (b) con respecto al tiempo a diferentes temperaturas y concentraciones.

La degradación del ICG en disolución acuosa se debe a la interacción de éste con los radicales e iones del disolvente, lo que lleva a la saturación de la cadena de dobles enlaces del ICG. Este hecho produce formas leuco del ICG, formas incoloras no fluorescentes incapaces de excitarse y emitir en el NIR [21]. La exposición a la luz aumenta la tasa de degradación en disolución acuosa. Debido a la presencia de luz, las moléculas de ICG se excitan (M^*) y tienden a formar radicales (M^\cdot) (Ecuación 3.1). Estos radicales interactúan con los iones y radicales del agua para producir formas leuco, lo que lleva a un aumento en la velocidad de degradación. Además, un aumento en la intensidad de la luz produce un mayor número de moléculas de ICG excitadas, lo que lleva a un aumento todavía superior en la tasa de degradación del ICG [21].



La explicación a una mayor tasa de degradación ante unas altas temperaturas se debe a un aumento de la cinética en la producción de radicales como consecuencia de la agitación térmica [21]. Como ya se había comentado, a mayor concentración de ICG menor es la tasa de degradación. Cuanto mayor es la concentración de ICG, hay un mayor número de moléculas de ICG que pueden colisionar con las moléculas de ICG ya excitadas (M^*) (Ecuación 3.2), consumiendo así estas moléculas de ICG excitadas. Esto lleva a una disminución en la tasa de degradación [21].



3.5 Estudio de liberación del ICG de las NPs

A continuación se compara el porcentaje de liberación de ICG en dos medios de liberación: H₂O Milli-Q y PBS. Como ya se ha comentado, se añadió un agente estabilizante (BSA) a las NPs para evitar la agregación que éstas sufren en PBS y en el medio de cultivo TSB. En el Anexo C.3 se muestra una imagen de las NPs de PLGA-ICG en PBS y las NPs de PLGA-ICG-BSA en PBS y en el medio de cultivo TSB, donde se muestra que la presencia del estabilizante evita la agregación de las NPs en PBS y en el medio de cultivo TSB, donde posteriormente se dispersan las bacterias para los

ensayos microbiológicos. También se muestra que, al añadir el agente estabilizante se consigue mantener la monodispersidad de las NPs sin estabilizante. Sin embargo, las NPs de PLGA-ICG-BSA presentan un mayor diámetro que aquellas que no contienen el agente estabilizante aunque sigue estando por debajo de 200 nm.

La Figura 3.6 muestra que al realizar la liberación del ICG de las NPs en H₂O Milli-Q y en PBS la curva de liberación es similar. En la Tabla 3.5 se observan los datos numéricos del porcentaje de liberación de ICG.

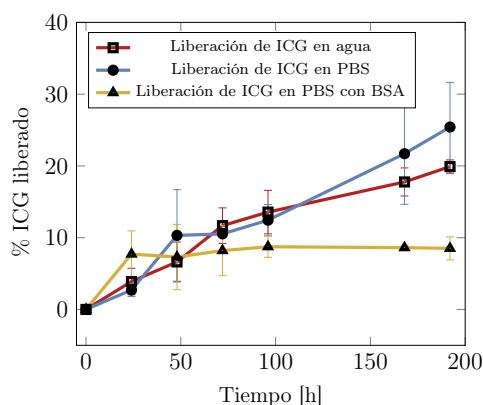


Figura 3.6: Porcentaje de liberación de ICG de las NPs de PLGA en agua, PBS y PBS+BSA.

% de liberación de ICG		
	A las 24h	A los 7 días
H ₂ O Milli-Q	3.89 ± 1.85	17.77 ± 1.95
PBS	2.72 ± 0.92	21.71 ± 7.05
PBS + BSA	7.71 ± 3.23	8.61 ± 0.34

Tabla 3.5: Porcentaje de liberación del ICG de las NPs a las 24h y a los 7 días en H₂O Milli-Q, PBS sin estabilizante y en PBS con estabilizante.

Nótese que al añadir el BSA como estabilizante, se libera una mayor cantidad de ICG durante las primeras 24 horas y, sin embargo, a partir de ese momento ya no se produce más liberación de ICG de las NPs. Durante las primeras horas, probablemente se libera el ICG que está más cerca de la superficie de las NPs de PLGA-ICG mientras que el ICG presente en el núcleo de las NPs no se llega a liberar. En cambio, al no estar presente el estabilizante, el ICG se va liberando de forma más sostenida en el tiempo, en primer lugar el ICG ubicado cerca de la superficie de las NPs y, por último, el ICG presente en la parte más interna de las NPs. Con agua como medio de liberación, el ICG que se encuentra en las cercanías de la superficie de las NPs se libera durante las primeras horas debido a la solubilidad que presenta el ICG en agua. Por tanto, en H₂O Milli-Q y PBS (sin BSA) el ICG se libera de forma más sostenida en el tiempo mientras que al añadir el estabilizante a las NPs se libera de forma más brusca durante las primeras 24 horas.

En el Anexo C.4.1 se muestran las gráficas de los ajustes matemáticos realizados para la cinética de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA. La Figura 3.7 muestra el ajuste matemático propuesto por Lindner Lippold, modelo que más se ajusta al

perfil de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA ($R^2 = 0.99979$). En la Tabla 3.6 se muestra la ecuación propuesta por Lindner Lippold así como los parámetros obtenidos en el ajuste matemático.

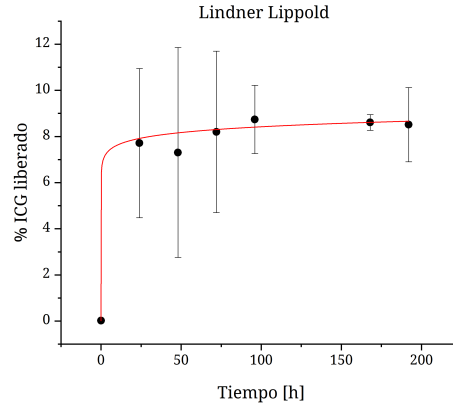


Figura 3.7: Ajuste matemático propuesto por Lindner Lippold para la cinética de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA.

Modelo matemático Lindner Lippold		
Ecuación	R^2	Parámetros
$\frac{M}{M_\infty} = K \cdot x^n + b$	0.99979	$K = 6.88$ $n = 0.04$ $b = 0.02$

Tabla 3.6: Ecuación y parámetros matemáticos obtenidos del ajuste matemático propuesto por Lindner Lippold para la cinética de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA.

Como se observa, la ecuación de la Tabla 3.6 presenta dos contribuciones: una primera contribución de la difusión del fármaco del interior de las NPs al exterior ($K \cdot x^n$) y una segunda contribución de la rápida liberación del fármaco que se encuentra en la superficie nada más ponerse en contacto con el medio de liberación (efecto *burst*, b) [44].

A la vista de los parámetros obtenidos, como $K > b$, la contribución de la difusión del fármaco del interior de las NPs al exterior es predominante. Por otra parte, n se refiere al mecanismo de liberación. Cuando $n = 0.66$ la contribución de la difusión y la contribución de erosión del polímero son iguales. En este caso, $n < 0.66$, lo que indica que hay una mayor contribución de difusión del ICG que de erosión del polímero. [45]. Como la contribución del efecto *burst* es pequeña, se puede afirmar que el ICG se encuentra encapsulado mayoritariamente en el interior de la partícula y no en la superficie de ésta [44].

3.6 Cuantificación de ROS

A continuación se observa la generación de oxígeno singlete para el ICG libre y encapsulado a distintas concentraciones (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm). Como se

indica en la Sección 2.8, la sonda SOSG reacciona con el $^1\text{O}_2$ para formar un endoperoxido que presenta picos de fluorescencia. Por tanto, cuanto mayor sea la concentración de $^1\text{O}_2$ en la muestra, mayor es la intensidad de la fluorescencia generada por el endoperoxido. La Figura 3.8 muestra que, en el caso del ICG libre, a mayor concentración mayor cantidad de $^1\text{O}_2$ se genera. Sin embargo, para el ICG encapsulado en NPs de PLGA, se genera mayor cantidad de $^1\text{O}_2$ conforme aumenta la concentración de ICG hasta el entorno de 100 ppm, decreciendo a mayores concentraciones. Así, para una concentración de 150 ppm, la cantidad de $^1\text{O}_2$ generada está incluso por debajo de la cantidad generada para una concentración de 50 ppm.

Este hecho puede ser debido a que a altas concentraciones de ICG encapsulado, parte de la luz es dispersada por las NPs y sale reflejada sin perder energía en otra dirección, por lo que hay una parte del ICG que no es activada, lo que lleva a una menor generación de $^1\text{O}_2$. Como para la concentración de ICG encapsulado de 150 ppm se observó una menor cantidad de $^1\text{O}_2$ generada, se descartó esta concentración de ICG para los ensayos microbiológicos. La estadística de ANOVA indica que existe diferencia significativa entre la cantidad de $^1\text{O}_2$ generada a distintas concentraciones para el ICG libre y encapsulado (pvalor < 0.05). También existen diferencias significativas entre la cantidad generada de $^1\text{O}_2$ del ICG libre y encapsulado (pvalor < 0.05).

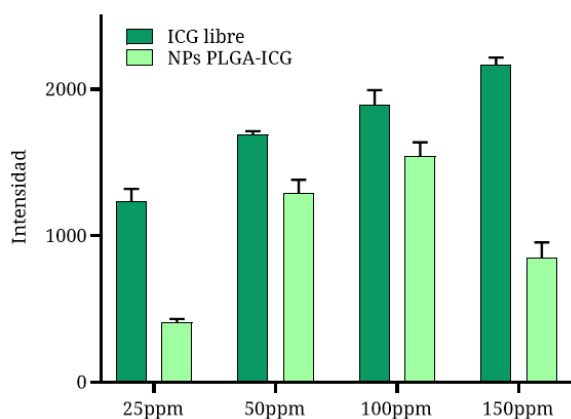


Figura 3.8: Cuantificación de ROS producidos por el ICG libre y encapsulado a distintas concentraciones de ICG medido a partir de la sonda SOSG.

3.7 Actividad fototérmica

En la Figura B.3 se muestra el aumento de la temperatura con el tiempo de irradiación.

Al irradiar una solución de 25 ppm de ICG libre durante 15 minutos, la temperatura aumenta hasta 42.77 °C. Sin embargo, irradiando durante 5 minutos (tiempo de irradiación utilizado en el experimento para evaluar la actividad antimicrobiana) la temperatura aumenta hasta 37 °C. En el caso de las NPs de PLGA-ICG la temperatura aumenta hasta 41 °C irradiando durante 15 minutos y hasta 36 °C irradiando durante 5 minutos. Por tanto, cabe concluir que al irradiar con luz láser la temperatura no aumenta lo suficiente como para inactivar a las bacterias, por lo que no existe un efecto fototérmico. Separadamente se hicieron experimentos en el grupo de investigación y se observó que a esa temperatura no se produce muerte bacteriana por lo que el

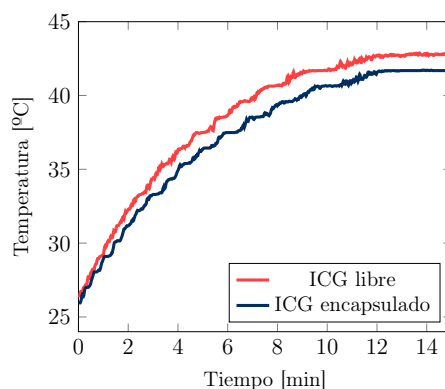


Figura 3.9: Aumento de la temperatura con respecto al tiempo de irradiación del ICG libre y de las NPs de PLGA-ICG.

poder antimicrobiano observado (mostrado en la Sección 3.8) sólo se debe a un efecto meramente fotodinámico.

3.8 Actividad antimicrobiana

Como se observa en la Figura 3.10 cuando el tratamiento antimicrobiano hace uso de la irradiación láser se observó una diferencia significativa con respecto al tratamiento sin irradiación láser ya que $p\text{valor} < 0.05$. En el caso de un tiempo de incubación de 24 horas, el tratamiento con el ICG libre parece tener un mayor efecto antimicrobiano que en el caso de las NPs de PLGA-ICG aunque no existen diferencias significativas ($p\text{valor} > 0.05$) Tampoco se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones tanto del ICG libre como encapsulado ($p\text{valor} > 0.05$). Como se determinó en el estudio de la cuantificación de ROS (Sección 3.6) se esperaría un mayor efecto antimicrobiano para una concentración de ICG de 100 ppm ya que a esta concentración se genera una mayor cantidad de $^1\text{O}_2$. Sin embargo, con esta concentración no se observa de forma significativa un mayor efecto antimicrobiano ($p\text{valor} > 0.05$). Esto se puede deber a que al aumentar la concentración de ICG se produce una desactivación de la fluorescencia (*quenching*) por concentración. Es decir, al aumentar la concentración de ICG libre, la luz no es capaz de llegar a todas las moléculas de ICG. Las moléculas de ICG que no son excitadas al no ser alcanzadas por la luz láser tienden a colisionar con aquellas moléculas de ICG excitadas por la luz, inactivando así la generación de ROS.

Por otra parte, para las NPs de PLGA-ICG, a mayor concentración cabría esperar una mayor liberación de ICG al medio, una mayor generación de ROS y, por tanto, un mayor efecto antimicrobiano. Sin embargo, este factor no es tan importante ya que cuanto mayor es la cantidad del ICG presente en el medio mayor es el efecto de desactivación de la fluorescencia (*quenching*) debido a la concentración, como ya se ha comentado. Además, parte del ICG que queda encapsulado en las NPs no llega a ser activado debido a la dispersión de la luz por las NPs, que sale reflejada en otra dirección. Para estudios realizados *in-vivo*, este efecto de la concentración no es tan crítico ya que las heridas tópicas serían de mayor tamaño y las NPs se podrían distribuir homogéneamente por toda la herida, por lo que las NPs no se encontrarían tan concentradas.

En la Figura 3.11 se comparan los distintos tiempos de incubación para los trata-

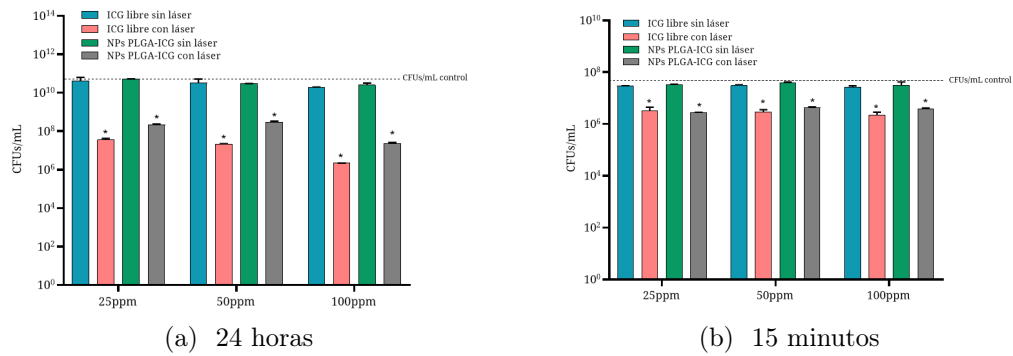


Figura 3.10: Viabilidad bacteriana para el ICG libre y encapsulado con un tiempo de incubación antes de irradiar de 24 horas (a) y de 15 minutos (b) con una concentración de ICG de 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm. *=diferencia significativa con el control (pvalor < 0.05).

mientos que hacen uso de la irradiación láser. Según el análisis estadístico de ANOVA existe diferencia significativa en el porcentaje de reducción de CFUs/mL para ambos tiempos de incubación. Cuando se incuba durante 24 horas antes de irradiar, se observa una mayor reducción de CFUs/mL que si se incuba durante 15 minutos. Como ya se vio, el ICG libre sufre una rápida degradación a 37 °C durante las primeras 24 horas (en torno al 60-70 % del ICG es degradado dependiendo de la concentración). Por esta razón cabría esperar un mayor efecto antimicrobiano con un tiempo de incubación de 15 minutos ya que la degradación que sufre en este caso es mucho menor. Sin embargo, se obtuvo un mayor efecto antimicrobiano para un tiempo de incubación de 24 horas. Esto se puede deber a que se requiere un mayor tiempo de contacto de las moléculas de ICG con las bacterias para que difundan en su interior. Durante 15 minutos de incubación puede no haber contacto suficiente con las bacterias. En el caso de las NPs de PLGA-ICG, cuando se dejan incubar durante 15 minutos no se libera mucha cantidad de ICG, por lo que en este caso se produce un menor efecto antimicrobiano. Por tanto, con una incubación de 24 horas se observó un mayor efecto antimicrobiano, sin diferencia significativa entre las distintas concentraciones de ICG y sin diferencia significativa entre el tratamiento con ICG libre y encapsulado.

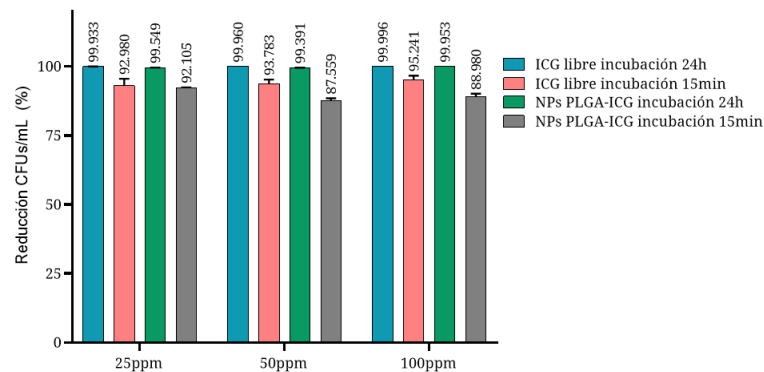


Figura 3.11: Porcentaje en la reducción de CFUs/mL para el ICG libre y encapsulado con un tiempo de incubación de 24 horas y 15 minutos

Capítulo 4

Conclusiones

A continuación se describen las conclusiones obtenidas en este trabajo:

- La técnica más adecuada de síntesis de NPs de PLGA-ICG resultó ser la técnica de emulsión doble en discontinuo con 1 mg de ICG ya que es la técnica que obtuvo una mayor carga de ICG en las NPs. Además, con esta técnica se obtuvieron NPs monodispersas alcanzando un mejor control del tamaño.
- Se confirmó la encapsulación de ICG en las NPs de PLGA mediante las imágenes del SEM, TEM y medidas a partir del espectrofotómetro de UV-visible.
- El ICG libre sufre una rápida degradación térmica en solución acuosa, que es dependiente de la concentración. A mayor temperatura mayor es la tasa de degradación y a mayor concentración del ICG menor es la tasa de degradación. Encapsulando el ICG en NPs se conseguía reducir, o incluso eliminar, la degradación térmica en solución acuosa del ICG.
- El ICG libre mostró una mayor capacidad de generar ROS, directamente proporcional a la concentración. Para el ICG encapsulado se obtuvo una concentración óptima para la cual se generaba la mayor cantidad de ROS.
- La evaluación de la actividad fototérmica indicó que, durante el tiempo de irradiación utilizado, no llegaba a aumentar significativamente la temperatura, por lo que se determinó que no existía efecto fototérmico. Por ello, el tratamiento antimicrobiano se debía únicamente a la actividad de las ROS que genera el ICG.
- Únicamente la combinación de la irradiación láser junto con el ICG, ya sea libre o encapsulado, mostraba efecto antimicrobiano.
- El tiempo de incubación de las NPs antes de irradiar es un parámetro importante a evaluar. Se observó un mayor efecto antimicrobiano con un tiempo de incubación de 24 horas, sin diferencia entre el tratamiento con ICG libre o ICG encapsulado, y también sin diferencia entre distintas concentraciones de ICG.

Por tanto, este trabajo muestra que la aPDT con ICG y una luz láser de 808 nm para el tratamiento de infecciones tópicas contra *S. aureus* es una alternativa prometedora al tratamiento tradicional con antibióticos.

Figuras

1.1	Diferencias en la estructura de las bacterias gram-positivas y gram-negativas.	3
1.2	Estructura química ICG.	6
1.3	Mecanismos de la generación de ROS en la aPDT.	7
1.4	Imágenes representativas del proceso de emulsión-evaporación del disolvente simple y doble.	9
1.5	Imágenes representativas del proceso de emulsión con evaporación del disolvente O/W-MF y W/O/W-MF.	10
2.1	Reacción de la sonda SOSG con el oxígeno singlete para la detección de oxígeno singlete	17
3.1	Desplazamiento en la longitud de onda del ICG libre y encapsulado. . .	21
3.2	Caracterización por FTIR del ICG libre, PLGA y NPs PLGA-ICG. . .	22
3.3	Imagen vista al SEM de las NPs PLGA-ICG.	23
3.4	Imagen vista al TEM de las NPs PLGA-ICG y su distribución de tamaño. . .	24
3.5	Porcentaje de degradación del ICG libre y encapsulado con respecto al tiempo a diferentes temperaturas y concentraciones.	25
3.6	Gráfica de liberación de ICG de las NPs de PLGA en PBS y agua . . .	26
3.7	Ajuste matemático para la cinética de liberación propuesto por Lindner Lippold.	27
3.8	Cuantificación de ROS del ICG libre y encapsulado a distintas concentraciones.	28
3.9	Aumento de la temperatura con respecto al tiempo de irradiación . . .	29
3.10	Viabilidad bacteriana de ICG libre y encapsulado a 24 horas y 15 minutos	30
3.11	Porcentaje en la reducción de CFUs/mL para el ICG libre y encapsulado	30
A.1	Esquema de la síntesis por emulsión simple y doble en discontinuo. . . .	48
A.2	Imágenes del TEM de los sobrenadantes para la optimización del proceso de lavado.	49
A.3	Micromezclador interdigital basado en PEEK	50
B.1	Recta de calibrado en agua/DMSO 5/95 y en agua Milli-Q.	52
B.2	Recta de calibrado en DMSO.	53
B.3	Imagen de las NPs PLGA-ICG tras irradiar 15 minutos para la medida del aumento de temperatura.	54
B.4	Imagen de las NPs PLGA-ICG con distintas concentraciones irradiando 5min para la evaluación de la actividad antimicrobiana.	55
C.1	Imagen vista al SEM de las NPs PLGA-ICG sintetizadas por O/W-MF	59

C.2	Imagen vista al SEM de las NPs PLGA-ICG sintetizadas por W/O/W-MF.	59
C.3	Imagen vista al SEM de las NPs PLGA sintetizadas por W/O/W.	60
C.4	NPs PLGA-ICG con BSA y sin BSA.	60
C.5	Imagen de las NPs de PLGA-ICG-BSA en TSB.	61
C.6	NPs PLGA-ICG-BSA vistas al SEM y su distribución de tamaño.	61
C.7	Ajuste matemático para el estudio de la cinética de liberación.	62
D.1	Diagrama de Gantt	63

Tablas

1.1	PSs más utilizados en aPDT.	4
3.1	Porcentaje de DL, EE, rendimiento y error para las distintas técnicas de emulsión.	19
3.2	Diametro hidrodinámico y polidispersidad de las NPs de PLGA-ICG y NPs de PLGA vacías.	22
3.3	Potencial zeta obtenido para las NPs de PLGA-ICG y NPs de PLGA vacías	22
3.4	Porcentaje de degradación del ICG libre y encapsulado a las 24h y 168h para distintas concentraciones y temperaturas.	24
3.5	Porcentaje de liberación del ICG de las NPs a las 24h y a los 7 días en agua y PBS	26
3.6	Ecuación y parámetros matemáticos obtenidos del ajuste matemático propuesto por Lindner Lippold para la cinética de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA.	27
C.1	Porcentaje de la carga de fármaco, eficiencia de encapsulación, rendimiento y error en el caso de las NPs de PLGA-ICG sintetizadas por emulsión simple O/W con distintas concentraciones de ICG.	57
C.2	Porcentaje de la carga de fármaco, eficiencia de encapsulación, rendimiento y error en el caso de las NPs de PLGA-ICG sintetizadas por emulsión doble W/O/W con distintas concentraciones de ICG.	57
C.3	Diámetro hidrodinámico [nm] e índice de polidispersidad de las NPs obtenidas por los métodos de emulsión en discontinuo (O/W y W/O/W) y en continuo (O/W MF y W/O/W MF).	58
C.4	Valores de potencial zeta [mV] de las NPs obtenidas por los métodos de emulsión en discontinuo (O/W y W/O/W) y en continuo (O/W MF y W/O/W MF).	58

Lista de Abreviaturas

<i>S. Aureus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de la varianza
aPDT	Terapia fotodinámica antimicrobiana
BSA	Albúmina de suero bovino
CFU	Unidades formadoras de colonias
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DL	Carga de fármaco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiencia de encapsulación
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU.
FTIR	Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
$h\nu$	Energía de un fotón (ecuación de Planck)
H ₂ O Milli-Q	Agua ultrapura
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO*	Radical hidroxilo
ICG	Verde de indocianina
ISC	Cruce inter-sistema
KCl	Cloruro potásico

M/M_{∞}	Fracción del fármaco liberado a un tiempo t
M^*	Molécula excitada
M^{\cdot}	Radical
NIR	Infrarrojo cercano
NP_s PLGA-ICG	Nanopartículas de PLGA encapsulando ICG
NP_s	Nanopartículas
O/W-MF	Emulsión simple en continuo
O/W	Emulsión simple
$O_2^{\cdot*}$	Radical superóxido
PBS	Tampón fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PDT	Terapia fotodinámica
PEEK	Poliéter-éter-cetona
PEG	Poli(etilenglicol)
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico)
ppm	Partes por millón
PS	Fotosensibilizador
P	Fosforescencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revolución por minuto
S^0	Estado singlete fundamental
S^n	Estado singlete excitado
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SOSG	Sonda verde de oxígeno singlete
T^1	Estado triplete excitado

TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TSA	Agar Triptona-Soja
TSB	Caldo Soja Tripticaseína
Uv-vis	Ultravioleta-visible
W/O/W-MF	Emulsión doble en continuo
W/O/W	Emulsión doble en discontinuo

Bibliografía

- [1] Philip G Bowler y col. “Multidrug-resistant organisms, wounds and topical antimicrobial protection”. En: *International wound journal* 9.4 (2012), págs. 387-396.
- [2] Michael R Hamblin y Tayyaba Hasan. “Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?” En: *Photochemical & Photobiological Sciences* 3.5 (2004), págs. 436-450.
- [3] Luciano Pereira Rosa y Francine Cristina da Silva. “Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections”. En: *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* 3.4 (2014), pág. 1.
- [4] Ghada S Omar, Michael Wilson y Sean P Nair. “Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light”. En: *BMC microbiology* 8.1 (2008), págs. 1-10.
- [5] Priyanga Dharmaratne y col. “Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review”. En: *European Journal of Medicinal Chemistry* (2020), pág. 112341.
- [6] Fabian Cieplik y col. “Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don’t”. En: *Critical Reviews in Microbiology* 44.5 (2018), págs. 571-589.
- [7] Deborah A Williamson, Glen P Carter y Benjamin P Howden. “Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: agents, action, and resistance patterns”. En: *Clinical microbiology reviews* 30.3 (2017), pág. 827.
- [8] Eduard Preis y col. “Biocompatible indocyanine green loaded PLA nanofibers for in situ antimicrobial photodynamic therapy”. En: *Materials Science and Engineering: C* (2020), pág. 111068.
- [9] Tak-Wah Wong y col. “Indocyanine Green—Mediated Photodynamic Therapy Reduces Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Drug Resistance”. En: *Journal of clinical medicine* 8.3 (2019), pág. 411.
- [10] Mikael Alsterholm, Nahid Karami y Jan Faergemann. “Antimicrobial activity of topical skin pharmaceuticals—an in vitro study”. En: *Acta dermato-venereologica* 90.3 (2010), págs. 239-245.
- [11] Jaber Ghorbani y col. “Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview”. En: *Laser therapy* 27.4 (2018), págs. 293-302.
- [12] Heidi Abrahamse y Michael R Hamblin. “New photosensitizers for photodynamic therapy”. En: *Biochemical Journal* 473.4 (2016), págs. 347-364.

- [13] Hassan Mahmoudi y col. “Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections”. En: *Journal of lasers in medical sciences* 9.3 (2018), pág. 154.
- [14] Ya-Hui Han y col. “Leveraging engineering of indocyanine green-encapsulated polymeric nanocomposites for biomedical applications”. En: *Nanomaterials* 8.6 (2018), pág. 360.
- [15] Abdulrahman A Balhaddad y col. “Prospects on Nano-Based Platforms for Antimicrobial Photodynamic Therapy Against Oral Biofilms”. En: *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery* (2020).
- [16] Tak-Wah Wong y col. “Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by indocyanine green and near infrared light”. En: *Dermatologica sinica* 36.1 (2018), págs. 8-15.
- [17] Karuppusamy Shanmugapriya y Hyun Wook Kang. “Engineering pharmaceutical nanocarriers for photodynamic therapy on wound healing”. En: *Materials Science and Engineering: C* 105 (2019), pág. 110110.
- [18] Antonio C Tedesco, Fernando L Primo y Priscila da Costa Carvalho de Jesus. “Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers”. En: *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. Elsevier, 2017, págs. 9-29.
- [19] Michaela B Reinhart y col. “Indocyanine green: historical context, current applications, and future considerations”. En: *Surgical innovation* 23.2 (2016), págs. 166-175.
- [20] Amira M Gamal-Eldeen y col. “Photodynamic therapeutic effect of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles and their anti-EGFR-conjugate in skin cancer in CD1 mice”. En: *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 10.4 (2013), págs. 446-459.
- [21] Vishal Saxena, Mostafa Sadoqi y Jun Shao. “Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution”. En: *Journal of pharmaceutical sciences* 92.10 (2003), págs. 2090-2097.
- [22] Jin Fu Zhou, Margaret P Chin y Steven A Schafer. “Aggregation and degradation of indocyanine green”. En: *Laser Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems IV*. Vol. 2128. International Society for Optics y Photonics. 1994, págs. 495-505.
- [23] Sonani Mindt y col. “Stability and degradation of indocyanine green in plasma, aqueous solution and whole blood”. En: *Photochemical & Photobiological Sciences* 17.9 (2018), págs. 1189-1196.
- [24] Vishal Saxena, Mostafa Sadoqi y Jun Shao. “Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems”. En: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 74.1 (2004), págs. 29-38.
- [25] Jordan Atchison y col. “Iodinated cyanine dyes: a new class of sensitizers for use in NIR activated photodynamic therapy (PDT)”. En: *Chemical Communications* 53.12 (2017), págs. 2009-2012.

- [26] Vishal Saxena, Mostafa Sadoqi y Jun Shao. "Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release". En: *International journal of pharmaceutics* 278.2 (2004), págs. 293-301.
- [27] Elena S Tuchina y col. "Phototoxic effect of conjugates of plasmon-resonance nanoparticles with indocyanine green dye on Staphylococcus aureus induced by IR laser radiation". En: *Quantum Electronics* 41.4 (2011), pág. 354.
- [28] Eliana Alves y col. "An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation". En: *Future medicinal chemistry* 6.2 (2014), págs. 141-164.
- [29] N Topaloglu y col. "The role of reactive oxygen species in the antibacterial photodynamic treatment: photoinactivation vs proliferation". En: *Letters in applied microbiology* 62.3 (2016), págs. 230-236.
- [30] Einat Cohen-Sela y col. "Single and double emulsion manufacturing techniques of an amphiphilic drug in PLGA nanoparticles: formulations of mithramycin and bioactivity". En: *Journal of pharmaceutical sciences* 98.4 (2009), págs. 1452-1462.
- [31] Muhammad Iqbal y col. "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation". En: *International journal of pharmaceutics* 496.2 (2015), págs. 173-190.
- [32] Isabel Ortiz de Solorzano y col. "Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: effect of passive mixing". En: *International journal of nanomedicine* 11 (2016), pág. 3397.
- [33] Rebecca L McCall y Rachael W Sirianni. "PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS". En: *Journal of visualized experiments: JoVE* 82 (2013).
- [34] Sijing Xiong y col. "Cellular uptake of Poly-(D, L-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation method". En: *Biotechnology journal* 6.5 (2011), págs. 501-508.
- [35] Mohamed Ayoub y col. "Study of the effect of formulation parameters/variables to control the nanoencapsulation of hydrophilic drug via double emulsion technique". En: *Journal of Biomedical Nanotechnology* 7.2 (2011), págs. 255-262.
- [36] Ane Larrea y col. "Efficient production of hybrid bio-nanomaterials by continuous microchannel emulsification: Dye-doped SiO₂ and Au-PLGA nanoparticles". En: *Chemical Engineering Journal* 316 (2017), págs. 663-672.
- [37] Tapan Kumar Giri y col. "Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery". En: *Saudi Pharmaceutical Journal* 21.2 (2013), págs. 125-141.
- [38] Samar Damiani y col. "Microfluidic devices for drug delivery systems and drug screening". En: *Genes* 9.2 (2018), pág. 103.
- [39] Erika González y col. "Implementación de la técnica de doble emulsión para la microencapsulación polimérica de moléculas iónicas". En: *Rev. Ib. Ci* 2 (2015), págs. 117-125.
- [40] Zou Tan y col. "Quantification of reactive oxygen species for photodynamic therapy". En: *Optics in Health Care and Biomedical Optics VII*. Vol. 10024. International Society for Optics y Photonics. 2016, pág. 100241C.

- [41] Huiyun Lin y col. “Feasibility study on quantitative measurements of singlet oxygen generation using singlet oxygen sensor green”. En: *Journal of fluorescence* 23.1 (2013), págs. 41-47.
- [42] Xavier Ragàs y col. “Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green®”. En: *Chemical Communications* 20 (2009), págs. 2920-2922.
- [43] Tobias Kiesslich y col. “A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms”. En: *BioMed research international* 2013 (2013).
- [44] Wolfram D Lindner y Bernhard C Lippold. “Drug release from hydrocolloid em-beddings with high or low susceptibility to hydrodynamic stress”. En: *Pharmaceutical research* 12.11 (1995), págs. 1781-1785.
- [45] Philip L Ritger y Nikolaos A Peppas. “A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices”. En: *Journal of controlled release* 5.1 (1987), págs. 37-42.
- [46] Edurne Luque-Michel y col. “A simple approach to obtain hybrid Au-loaded polymeric nanoparticles with a tunable metal load”. En: *Nanoscale* 8.12 (2016), págs. 6495-6506.