

Anexos

Anexo A

Síntesis de nanopartículas

A.1 Protocolo de emulsión-evaporación simple y doble mediante el uso de ultrasonidos.

El protocolo de síntesis para la técnica de emulsión simple y doble en discontinuo está descrito en el artículo [32] y [46], respectivamente.

Para la síntesis por **emulsión simple**, se pesan 50 mg de PLGA Resomer RG 504 25G y 150 mg de pluronic F68 (surfactante) y se disuelven en 5 mL de disolvente orgánico volátil (acetato de etilo 99.6%). Por otra parte, se pesa una cierta cantidad de ICG y se disuelve en 200 μ L de DMSO, que se añade a la disolución que contiene el PLGA. Se añaden 10 mL de agua Milli-Q. Esta disolución se somete a ultrasonidos a una amplitud del 40% durante 25 segundos a una potencia de 450 W. Posteriormente, se deja agitando durante 3 horas a 600 rpm para conseguir la evaporación del acetato de etilo. Una vez se ha evaporado, se centrifuga a 7500 rpm durante 15 minutos. Se retira el sobrenadante y éste se centrifuga a 13000 rpm 15 minutos. Los precipitados obtenidos en ambas centrifugaciones se juntan y se añaden 10 mL de agua Milli-Q. Se repite el proceso de lavado y las NPs obtenidas finalmente se redispersan en una cierta cantidad de agua Milli-Q en función de la concentración de NPs deseada (en este caso 2 mL).

Para la síntesis por **emulsión doble**, se pesan 50 mg de PLGA Resomer RG 504 25G y se disuelven en 3 mL de acetato de etilo 99.6%. Por otra parte, se pesa una cierta cantidad de ICG y se disuelve en 1 mL de agua Milli-Q, que se añade a la disolución que contiene el PLGA. Esta disolución se somete a ultrasonidos a una amplitud del 40% durante 20 segundos a una potencia de 450 W. Se añaden 8 mL de surfactante (colato sódico al 1%) y se vuelve a sonicar con una amplitud del 40% durante 40 segundos a una potencia de 450 W. Se añaden 12 mL de colato sódico al 0.3% para terminar de estabilizar la emulsión. Se deja agitando durante 3 horas a 600 rpm para conseguir la evaporación del acetato de etilo. Una vez se ha evaporado, se centrifuga a 7500 rpm durante 15 minutos. Se retira el sobrenadante y éste se centrifuga a 13000 rpm 15 minutos. Los precipitados obtenidos en ambas centrifugaciones se juntan y se añaden 10 mL de agua Milli-Q. Se repite el proceso de lavado y las NPs finalmente se redispersan en una cierta cantidad de agua Milli-Q en función de la concentración de NPs deseada (en este caso 2 mL).

En la Figura A.1 se muestra esquemáticamente el protocolo seguido para los procesos de emulsión-evaporación simple y doble en discontinuo.

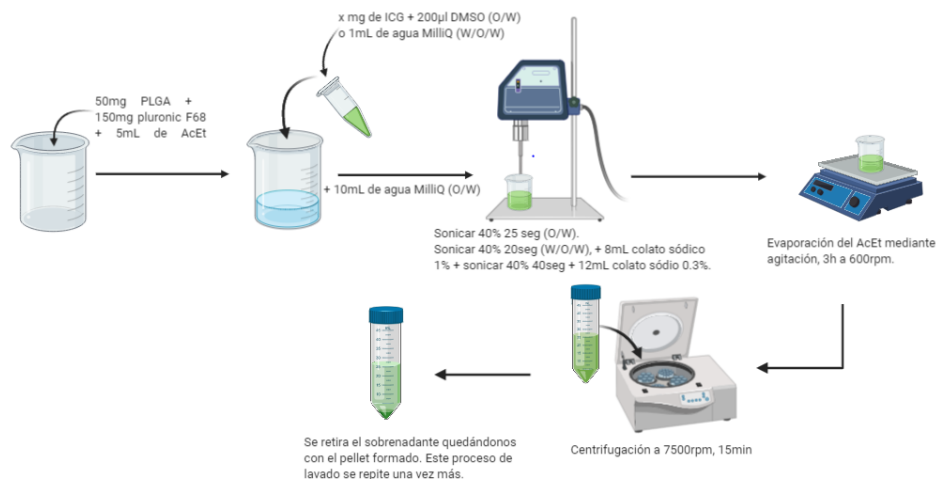


Figura A.1: Esquema del protocolo seguido para la emulsión simple y doble en discontinuo.

A.1.1 Proceso de optimización del lavado

Se realizó un proceso de optimización del lavado para conseguir precipitar el mayor número de NPs posible. Inicialmente, el proceso de lavado consistía en una única centrifugación de las NPs a 7500 rpm. Se hicieron las siguientes pruebas para el proceso de optimización de lavado:

1. 7500 rpm, 15 minutos (proceso de lavado inicial). Las NPs se redispersaron bien pero en el sobrenadante seguían quedando NPs de 100 nm (observado por dispersión dinámica de la luz).
2. 7500 rpm, 30 minutos. Las NPs se redispersan bien pero siguen quedando NPs en el sobrenadante.
3. Un primer lavado a 7500 rpm 15 minutos y un segundo lavado a 13000 rpm 15 minutos. Se llevaron ambos sobrenadantes para visualizar al TEM (Figura A.2).

El proceso de lavado óptimo fue el del último punto, en el que realiza una primera centrifugación de las NPs a 7500 rpm con el objetivo de precipitar las NPs de mayor tamaño y, posteriormente, una segunda centrifugación del sobrenadante a la máxima velocidad (13000 rpm) para precipitar las NPs de menor tamaño. En el primer sobrenadante se observa un número significativo de NPs que no han precipitado. Sin embargo, el segundo sobrenadante muestra un número de NPs mucho más reducido. Con este proceso de optimización de lavado se consigue, por tanto, precipitar el mayor número de NPs, aumentando así el rendimiento de la síntesis.

A.2 Protocolo de emulsión-evaporación simple y doble mediante tecnología microfluídica.

Para la síntesis de emulsión en discontinuo simple y doble se ha seguido el protocolo descrito en los artículos [32] y [36], respectivamente.

Para el caso de **emulsión simple en continuo**, se disolvieron 200 mg de PLGA Resomer RG 504 25G y 600 mg de pluronic F68 (surfactante) en 20 mL de acetato

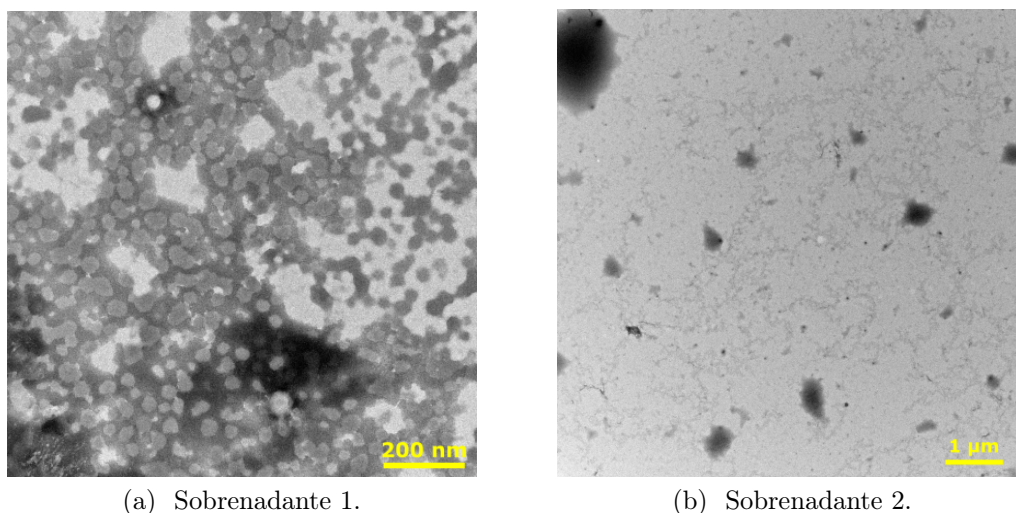


Figura A.2: Imágenes del TEM del sobrenadante tras centrifugar a 7500 rpm 15 minutos (a), y del sobrenadante final tras centrifugar el primer sobrenadante a 13000 rpm 15 minutos (b)

de etilo 99.6% (fase orgánica). Se añadieron 5.2 mg de ICG disueltos en 800 μ L de DMSO. Esta fase orgánica se introdujo en una jeringuilla de plástico. Por otra parte, en otra jeringuilla de plástico se añadieron 40 mL de agua Milli-Q (fase acuosa). Se utilizaron distintas proporciones de flujo para ambas corrientes con la ayuda de una bomba (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). El caudal de la fase orgánica era de 16 mL/min mientras que el caudal de la fase acuosa era de 32 mL/min. Ambas soluciones se alimentaron a través de un tubo de PTFE y se mezclaron en el micromezclador interdígital basado en poliéter-éter-cetona o PEEK (Micro4 Industries GmbH, Mainz, Alemania) para formar la emulsión (Figura A.3). Este dispositivo se introdujo en un baño de hielo para evitar la rápida evaporación del disolvente orgánico y el calentamiento de la mezcla. Tras la formación de una emulsión estable, el disolvente orgánico se evaporó mediante agitación a 600 rpm durante 3 horas. A continuación, se realizó el proceso de lavado de la misma manera que en el caso de una emulsión en discontinuo. Este proceso de síntesis se realizó por triplicado.

También se prepararon NPs de PLGA-ICG por emulsión-evaporación doble mediante la tecnología de microfluídica. Para el proceso de **emulsión doble en continuo** se utilizaron dos micromezcladores consecutivos. Para la fase orgánica se disolvió 200 mg de PLGA Resomer RG 504 25G en 12 mL de acetato de etilo 99.6%. Para la fase acuosa se disolvió 10 mg de ICG en 10 mL de agua Milli-Q. Ambas corrientes se inyectaron, con ayuda de una bomba (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) a través de un tubo de PTFE y se mezclaron en el primer micromezclador (Micro4 Industries GmbH, Mainz, Alemania) con un caudal de flujo para la fase orgánica de 13.5 mL/min y un caudal de flujo para la fase acuosa de 4.5 mL/min. Esta primera emulsión resultante producida en el primer micromezclador fue inyectada en el segundo micromezclador junto con una tercera corriente que contenía 50 mL de colato sódico 1% como surfactante. Esta tercera corriente tenía un caudal de flujo de 36 mL/min. Este dispositivo se introdujo en un baño de hielo para evitar la rápida evaporación del disolvente orgánico. Una vez realizada la segunda emulsión se añadió 50 mL de colato de sodio 0.3% para terminar

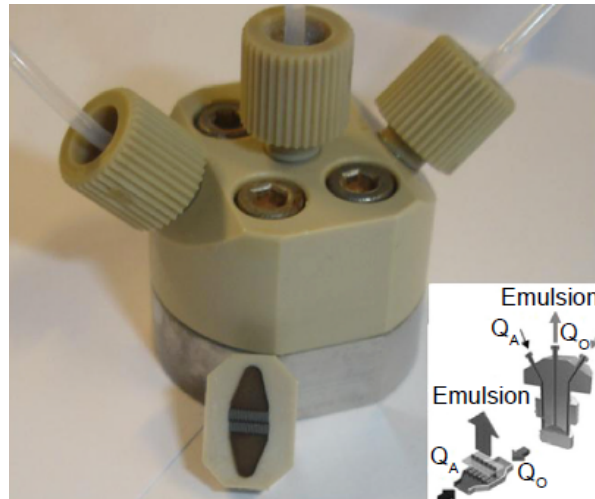


Figura A.3: Micromezclador interdigital basado en PEEK.

de estabilizar la emulsión. El disolvente orgánico se evaporó tras su agitación a 600 rpm durante 3 horas. Finalmente, se realizó el mismo proceso de lavado optimizado para el método en discontinuo. Se realizaron tres réplicas para cada proceso de síntesis.

Anexo B

Materiales y métodos

B.1 Curvas de calibración utilizadas para la determinación de DL y EE.

Las concentraciones de ICG encapsulada y no encapsulada se ha determinado a partir del espectro de absorbancia del cromóforo en la disolución de NPs y en la disolución del sobrenadante, respectivamente.

Para determinar la concentración de ICG encapsulada, se han preparado unos patrones de calibrado con una concentración perfectamente conocida de ICG entre 0.5 ppm y 5 ppm utilizando como disolvente una mezcla de agua Milli-Q/DMSO con una proporción 5:95 (Figura B.1a). El máximo de absorbancia se encuentra a 794 nm. Para determinar la concentración de ICG no encapsulada, se prepararon unos patrones de calibrado con una concentración perfectamente conocida de ICG entre 0.5 ppm y 5 ppm utilizando como disolvente agua Milli-Q (Figura B.1b). El máximo de absorbancia en este caso se encuentra a 779 nm. Para la cuantificación del ICG encapsulado y no encapsulado fue necesario diluir la muestra para que los valores de absorbancia estén dentro del rango de la recta de calibrado.

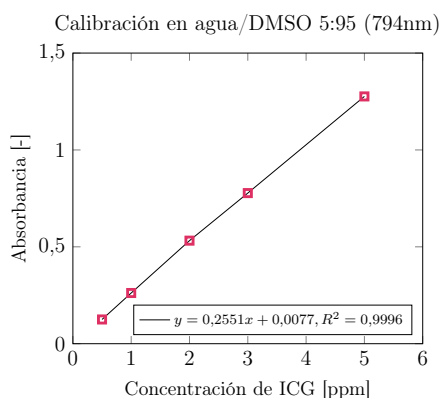
B.2 Espectrofotometría Ultravioleta-visible (UV-vis)

Para determinar la concentración de ICG encapsulada en las NPs PLGA-ICG obtenidas por la técnica óptima se añadió 50 μL de la disolución de NPs y 950 μL de DMSO para disolver las NPs y permitir al ICG salir de ellas. Como línea base se introdujo una disolución $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ con una proporción 5:95. Para determinar la concentración de ICG no encapsulada (sobrenadante) se añadió 50 μL de sobrenadante y 950 μL de agua Milli-Q. Como línea base se utilizó agua Milli-Q.

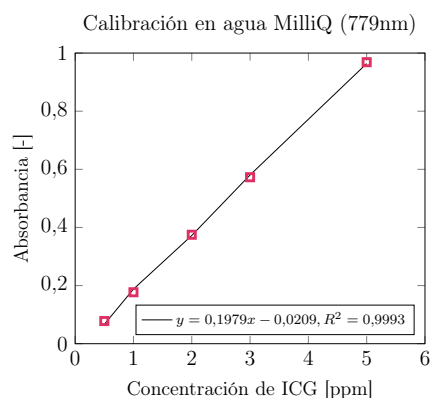
B.3 Caracterización de las NPs

B.3.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

Para determinar el tamaño hidrodinámico y la polidispersidad de las NPs se añadieron 3 gotas aproximadamente de la dispersión de NPs en una cubeta con 3/4 aproximadamente de agua Milli-Q. La cubeta fue sonicada antes de la medida y se determinó



(a) Calibrado agua Milli-Q/DMSO 5:95 (794 nm)



(b) Calibrado agua Milli-Q (779 nm)

Figura B.1: Recta de calibrado con patrones preparados con una concentración perfectamente conocida de ICG entre 0.5 ppm y 5 ppm utilizando como disolvente una mezcla agua/DMSO 5:95 (a) para determinar la concentración de ICG encapsulada en las NPs y utilizando como disolvente agua Milli-Q (b) para determinar la concentración de ICG no encapsulada.

la media del diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad de esta suspensión homogénea de NPs. Cada medida se realizó por triplicado.

B.3.2 Potencial zeta

Para medir el potencial zeta se añadieron tres gotas de la disolución de NPs en una cubeta con 1/4 aproximadamente de KCl 1 mM a pH 7, que actúa como electrolito de la disolución. Esta suspensión se sonicó antes de la medida. Posteriormente, se introdujo con cuidado un electrodo de forma cuidadosa para que no se dé la aparición de burbujas entre el electrodo y la disolución. Finalmente se introdujo la cubeta en el instrumento y se realizó la medida.

B.3.3 FTIR

Para la medida de los espectros de FTIR es necesario tener la muestra en sólido. En un portamuestras, se echó una gota de la dispersión de las NPs de PLGA vacías y las NPs de PLGA-ICG. Se dejó secar en una incubadora a 37 °C. Una vez se secó la gota, se añadió otra gota y se repitió el proceso. Este proceso se repitió hasta que se observó una capa homogénea de NPs en el portaobjetos, la cual se procedió a medir.

B.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En primer lugar se diluyó la disolución de NPs en agua Milli-Q con el objetivo de conseguir una imagen con las NPs individuales. La muestra diluida se depositó en un portamuestras pegado a una cinta conductora de carbono de doble cara. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, la muestra se recubrió con Pd antes de ser visualizado por el microscopio.

B.3.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La muestra a observar por TEM se diluyó en agua Milli-Q directamente en un papel parafilm. Se cogió una gota y se depositó en una rejilla de cobre. Esta rejilla de cobre se impregnó durante 15 minutos en un agente de contraste (ácido fosfotúngstico 30 mg/mL). La rejilla se guardó para su posterior visualización por TEM.

B.4 Estudio de estabilidad de las NPs de PLGA-ICG y del ICG libre

Se prepararon las distintas disoluciones de ICG libre y NPs (50 ppm y 100 ppm) en varios eppendorfs. Cada eppendorf correspondía a un tiempo de medida (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h, 192 h). Para el estudio de estabilidad del ICG libre, una parte de los eppendorf preparados se mantuvo en una incubadora a 37 °C en agitación y otra parte se mantuvo en la nevera a 4 °C. La absorbancia se midió directamente en el tiempo de medida correspondiente. Para el estudio de estabilidad de las NPs de PLGA-ICG la absorbancia no se midió directamente. Antes de la medida de absorbancia, la disolución de NPs se centrifugó a 13300 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante con el objetivo de eliminar la contribución del ICG liberado de las NPs. El pellet se redispersó en DMSO para romper las NPs y cuantificar el ICG dentro de las mismas.

B.5 Estudio de liberación del ICG de las NPs

Para realizar el estudio de liberación de forma indirecta, se añadió una cantidad conocida de NPs de PLGA-ICG en PBS y en agua Milli-Q y una cantidad conocida de NPs de PLGA-ICG-BSA en PBS. Se prepararon distintos eppendorfs y cada uno correspondía a un tiempo de medida (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h y 192 h). Estos eppendorfs se introdujeron en un incubador a 37 °C cubiertos con papel de aluminio para proteger las muestras de la luz.

Se cogió el eppendorf correspondiente a cada tiempo de medida y se centrifugó a 13300 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, las NPs precipitadas se redispersaron en DMSO y se cuantificó el ICG encapsulado a partir de una recta de calibrado en DMSO (Figura B.2).

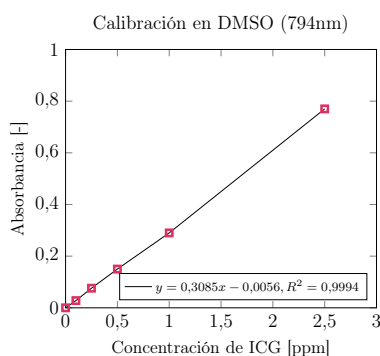


Figura B.2: Recta de calibrado con patrones preparados con una concentración perfectamente conocida de ICG entre 0.1ppm y 2.5ppm utilizando como disolvente DMSO para determinar la concentración de ICG encapsulada en las NPs.

B.6 Cuantificación de ROS

Para la cuantificación de ROS, en una placa de 96 pocillos, se prepararon disoluciones a diferentes concentraciones de ICG tanto libre (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm) como encapsulado por la técnica más óptima. Posteriormente, estos pocillos fueron irradiados con luz láser diodo de 808 nm a una irradiancia de 1 W/cm^2 durante 5 minutos. Se realizó la medida de la intensidad de fluorescencia de cada pocillo (pico de excitación a 504 nm y pico de emisión a 525 nm) mediante un lector de placas Multimode Synergy HT microplate reader (Biotek, WI, USA). Estas condiciones de irradiación y las diferentes concentraciones de ICG utilizadas son las mismas que las que se utilizarán para evaluar la actividad antimicrobiana. Estas disoluciones se prepararon por triplicado para realizar la estadística correspondiente.

B.7 Actividad fototérmica

Para evaluar la actividad fototérmica se preparó una disolución de 25 ppm de ICG y se irradió durante 15 minutos con un láser diodo de 808 nm con una irradiancia de 1 W/cm^2 . El aumento de temperatura debido a la irradiación se determinó mediante una sonda de temperatura. En la Figura B.3 se muestra una imagen de las NPs de PLGA-ICG con la sonda de temperatura tras irradiar 15 minutos.

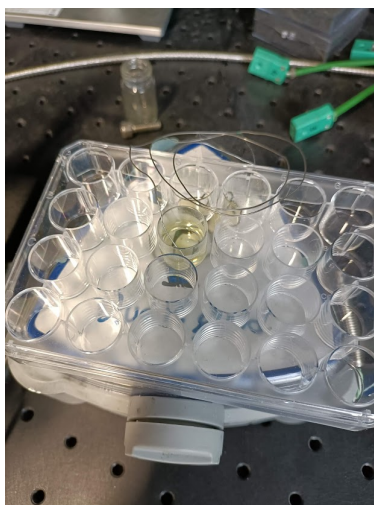


Figura B.3: Imagen de las NPs PLGA-ICG tras irradiar 15 minutos para la medida del aumento de temperatura.

B.8 Actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana, se preparó una suspensión de *S. aureus* en 4 mL de medio de cultivo TSB (*Tryptic Soy Broth*) añadiendo colonias crecidas en placas de agar (*Trypto-Casein Soy Agar*, TSA). Esta suspensión bacteriana se dejó incubando 24 horas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm para su crecimiento hasta la fase estacionaria (1×10^{10} CFU/mL).

Una vez en la fase estacionaria, se diseñó el experimento. El cultivo de bacterias (1×10^{10} CFU/mL) se diluyó hasta 5×10^6 CFU/mL en el caso de que el tiempo de incubación sea de 24 horas y hasta 5×10^8 CFU/mL en el caso de que el tiempo de incubación sea de 15 minutos. Para ello, se prepararon disoluciones de 200 ppm, 100 ppm y 50 ppm de ICG (libre y encapsulado) en TSB para, posteriormente diluirlas a la mitad (100 ppm, 50 ppm y 25 ppm) con 100 μ L de la disolución de bacterias diluida, teniendo un volumen final de 200 μ L. Las disoluciones control contenían 100 μ L de TSB y 100 μ L de la disolución de bacterias.

Estas disoluciones se incubaron en la oscuridad un cierto tiempo (15 minutos o 24 horas dependiendo del experimento). Además, se realizaron dos experimentos de forma simultánea, un experimento con irradiación y otro sin irradiación. Las disoluciones correspondientes al experimento con irradiación se añadieron a los pocillos de una placa de 96 pocillos y se irradiaron durante 5 minutos con luz láser de 808 nm de irradiancia 1 W/cm^2 (Figura B.4.) En una nueva placa de 96 pocillos, se añadió a cada pocillo 20 μ L de una disolución que contiene ICG libre o encapsulado y una disolución bacteriana (del experimento con irradiación y sin ella). Posteriormente se añadió 180 μ L de PBS. Estas disoluciones de los pocillos fueron diluidas siguiendo el método de dilución seriada. Posteriormente, se depositaron 25 μ L de las muestras diluidas en placas Petri preparadas con el medio nutricional de agar (TSA). Estas placas se incubaron durante 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente, se contó el número de unidades formadoras de colonias (CFU/mL). Todos los experimentos fueron repetidos tres veces.

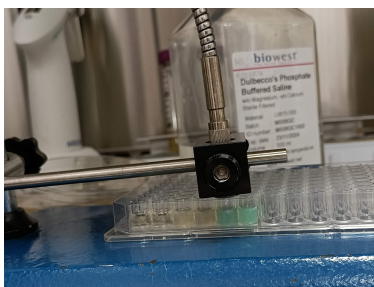


Figura B.4: Imagen de las NPs PLGA-ICG con distintas concentraciones irradiando 5min para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

Anexo C

Resultados y discusión

C.1 Determinación de la carga de fármaco, eficiencia de encapsulación y balance de materia.

En la Tabla C.1 se muestran los resultados de DL, EE, error y rendimiento (en porcentaje) para las distintas concentraciones de ICG probadas para la técnica de emulsión en discontinuo simple. En la Tabla C.2 se muestran los resultados para las distintas concentraciones de ICG probadas en la técnica de síntesis de emulsión doble.

Emulsión simple (O/W)						
Masa de ICG [mg]	DL _{teórico} [%]	DL _{exp. directo} [%]	DL _{exp. indirecto} [%]	EE [%]	Error [%]	Rendimiento [%]
0.625	1.24	0.33 ± 0.05	1.01 ± 0.05	9.73 ± 1.86	20.24 ± 3.90	36.85 ± 4.73
1.3	2.53	0.61 ± 0.08	1.56 ± 0.91	7.80 ± 1.17	19.39 ± 2.42	32.96 ± 1.61

Tabla 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.

Emulsión doble (W/O/W)						
Masa de ICG [mg]	DL _{teórico} [%]	DL _{exp. directo} [%]	DL _{exp. indirecto} [%]	EE [%]	Error [%]	Rendimiento [%]
0.625	1.24	0.45 ± 0.01	0.95 ± 0.07	16.04 ± 0.31	17.81 ± 1.66	44.31 ± 2.27
1	1.96	0.85 ± 0.05	1.54 ± 0.36	17.15 ± 1.92	13.63 ± 6.12	39.74 ± 4.82

Tabla 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.

Para la emulsión O/W se consiguió un mayor DL al añadir 1.3 mg de ICG. Para la emulsión W/O/W se consiguió un mayor DL para 1 mg de ICG, cantidad máxima que se pudo probar debido al límite de solubilidad del ICG.

C.2 Caracterización de las NPs

C.2.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

En la Tabla C.3 se muestran los valores del diámetro hidrodinámico y polidispersidad obtenidas mediante el DLS para las distintas técnicas de emulsión.

Técnica de síntesis	Diámetro hidrodinámico [nm]	Polidispersidad [-]
O/W 1.3mgICG	155.3 ± 46.5	0.091 ± 0.023
O/W-MF 1.3mgICG	292.0 ± 55.8	0.202 ± 0.026
W/O/W 1mgICG	170.0 ± 47.0	0.077 ± 0.009
W/O/W-MF 1mgICG	402.2 ± 110.3	0.161 ± 0.005

Tabla 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).

Las NPs obtenidas por el método en discontinuo son de mayor tamaño (292 nm y 402 nm para O/W-MF y W/O/W-MF, respectivamente). Además, el índice de polidispersidad es mayor para los métodos en continuo. Las NPs obtenidas por emulsión W/O/W tienen un mayor diámetro que aquellas obtenidas por emulsión O/W ya que las NPs obtenidas por emulsión W/O/W contienen tres fases (dos fases acuosas y una fase orgánica).

C.2.2 Potencial zeta

En la Tabla C.4 se muestran los valores de potencial zeta para 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). El potencial zeta para los métodos de emulsión doble es mayor que para aquellos métodos de emulsión simple debido a la presencia del surfactante (colato sódico), que tiene carga negativa. La emulsión simple tiene menor potencial zeta debido a que utiliza como surfactante pluronic, que tiene carga neutra. Aun así sigue teniendo potencial negativo debido a la carga negativa del ICG. El potencial zeta de las NPs obtenidas por el método de emulsión en continuo es más negativo. Una hipótesis podría ser que esta diferencia en el potencial zeta se puede deber a una distinta distribución de ICG en la NP, es decir, el ICG podría estar ubicado mayoritariamente en la superficie de las NPs en vez de en el interior de esta.

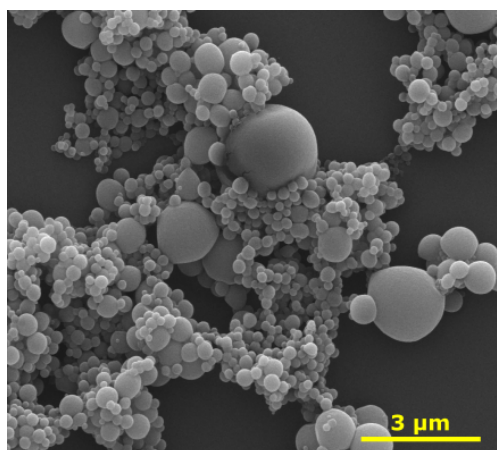
Técnica de síntesis	Potencial zeta [mV]
O/W 1.3mgICG	-28.48 ± 5.46
O/W-MF 1.3mgICG	-50.82 ± 1.29
W/O/W 1mgICG	-44.14 ± 5.79
W/O/W-MF 1mgICG	-72.23 ± 5.78

Tabla 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).

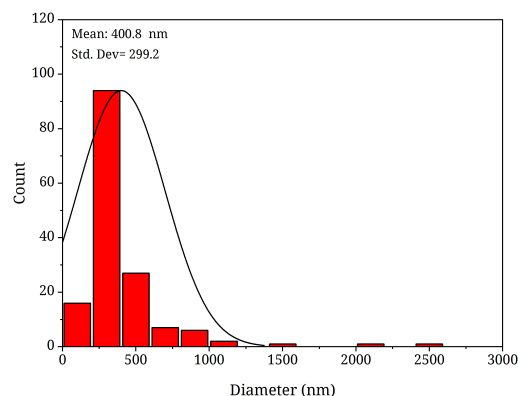
C.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la Figura C.1 y C.2 se muestran las imágenes del SEM y la gráfica de distribución de tamaño de las NPs sintetizadas por O/W y W/O/W en continuo, respectivamente. Se muestra una alta polidispersidad de las NPs y una ancha distribución de tamaño. Las NPs obtenidas por W/O/W en continuo tienen un mayor tamaño que aquellas obtenidas por O/W en continuo.

En la Figura C.3 se muestra la imagen por SEM y la gráfica de distribución de tamaño de las NPs de PLGA vacías obtenidas por W/O/W en discontinuo. Son NPs monodispersas con una estrecha distribución de tamaño y de un diámetro de 125 nm.

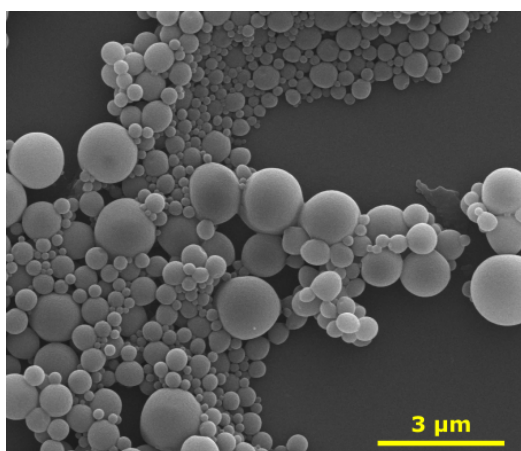


(a) NPs PLGA-ICG vistas al SEM

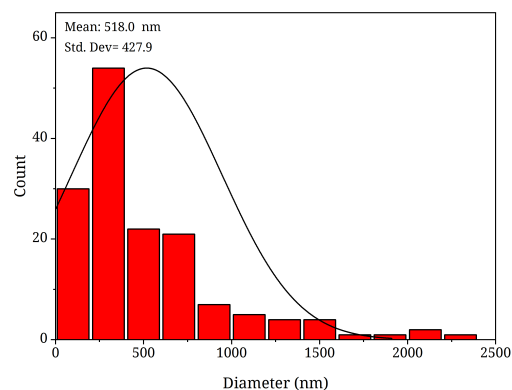


(b) Distribución de tamaño de las NPs PLGA-ICG sintetizadas por O/W MF

Figura C.1: Imagen vista al SEM de las NPs PLGA-ICG obtenidas por O/W en continuo (a), y su distribución de tamaño correspondiente (b)



(a) NPs PLGA-ICG vistas al SEM



(b) Distribución de tamaño de las NPs PLGA-ICG sintetizadas por W/O/W MF

Figura C.2: Imagen vista al SEM de las NPs PLGA-ICG obtenidas por W/O/W en continuo (a), y su distribución de tamaño correspondiente (b).

C.3 Presencia de un agente estabilizante en las NPs de PLGA-ICG

En la Figura C.4 se muestra que las NPs de PLGA-ICG tienden a agregarse en PBS o en TSB sin la presencia del estabilizador BSA. El BSA evita la agregación de las NPs en estos medios.

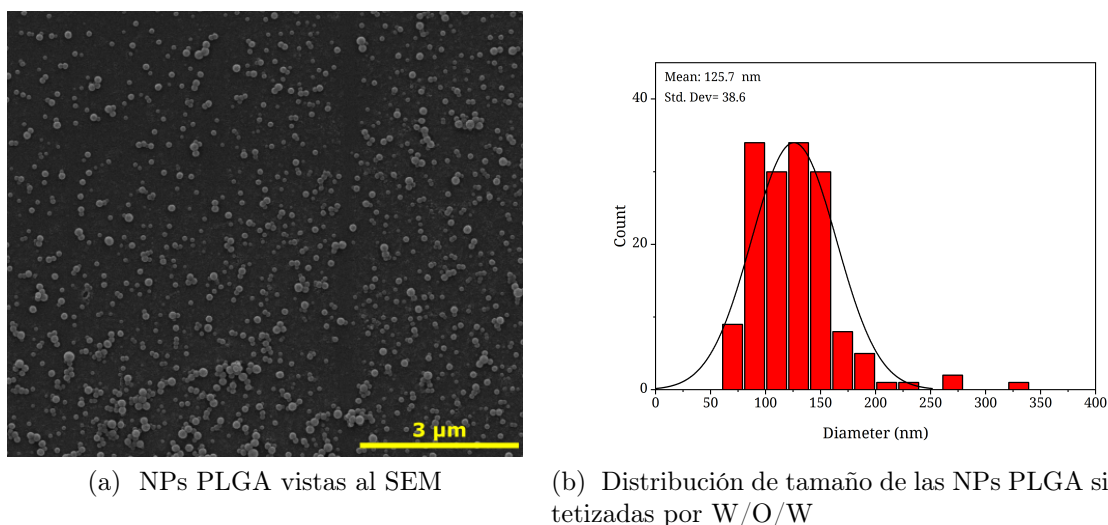


Figura C.3: Imagen vista al SEM de las NPs PLGA obtenidas por W/O/W en discontinuo (a), y su distribución de tamaño correspondiente (b).

En la Figura C.5 se muestra que la presencia de TSB evita la agregación de las NPs de PLGA-ICG en el medio de cultivo TSB.

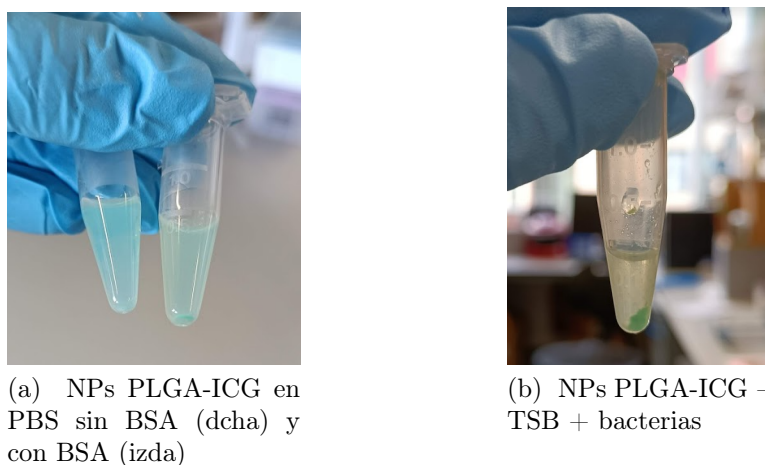


Figura C.4: NPs de PLGA-ICG en PBS con BSA y sin BSA (a), y NPs de PLGA-ICG en TSB junto con la suspensión bacteriana sin BSA (b).

C.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las NPs de PLGA-ICG-BSA

En la Figura C.6 se muestra la imagen del SEM de las NPs de PLGA-ICG-BSA y su correspondiente distribución de tamaño. Al añadir el agente estabilizante, las NPs tienen un diámetro medio de 187.01 ± 32.67 nm. Cabe destacar que al añadir el agente estabilizante las NPs presentan un mayor tamaño que en ausencia del estabilizante (136.66 ± 34.86 nm), aunque esta diferencia no es muy significativa. Al añadir el agente estabilizante las NPs mantienen su monodispersidad.

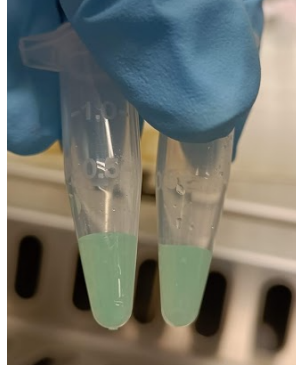
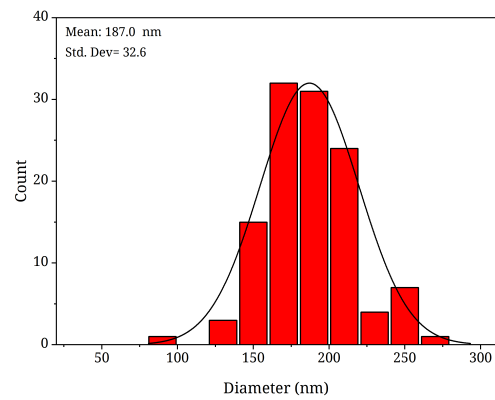
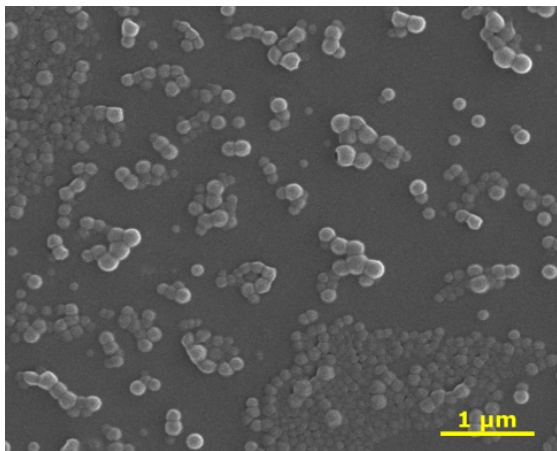


Figura C.5: Imagen de las NPs de PLGA-ICG-BSA en TSB.



(a) NPs PLGA-ICG-BSA vistas al SEM

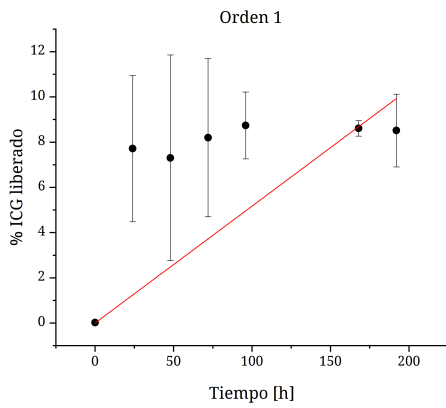
(b) Distribución de tamaño NPs PLGA-ICG-BSA

Figura C.6: NPs de PLGA-ICG-BSA vistas al SEM (a), y distribución de tamaño de las NPs de PLGA-ICG-BSA (b).

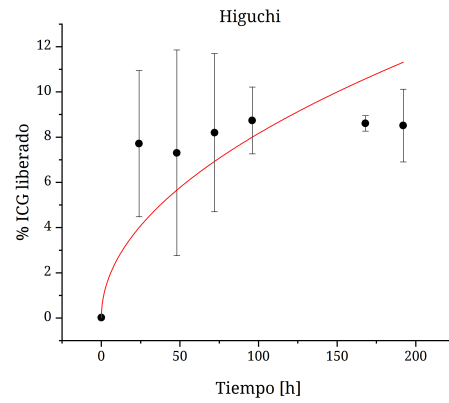
C.4 Estudio de la cinética de liberación

C.4.1 Ajuste matemático de la cinética de liberación

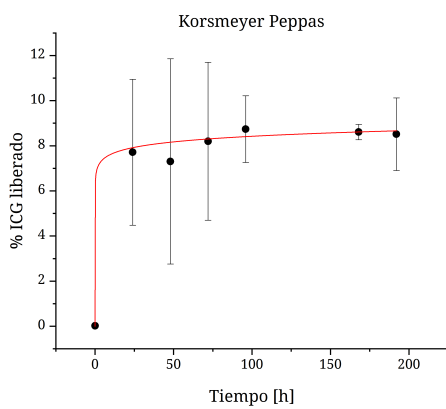
En la Figura C.7 se muestran las gráficas correspondientes al ajuste matemático de la cinética de liberación de las NPs de PLGA-ICG-BSA.



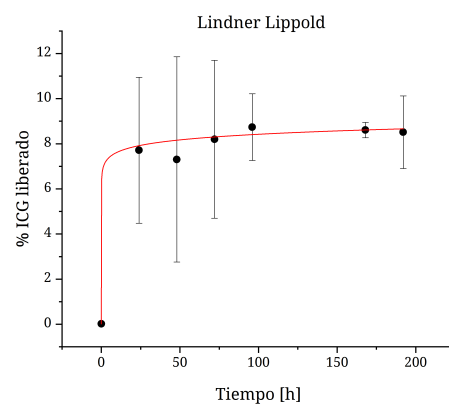
(a) Orden 1, $R^2 = 0.97472$



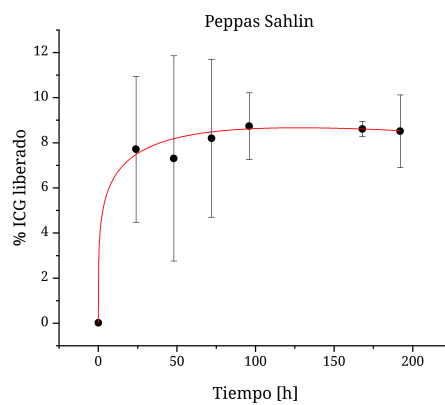
(b) Higuchi, $R^2 = 0.92864$



(c) Korsmeyer Peppas, $R^2 = 0.99313$



(d) Lindner Lippold, $R^2 = 0.99979$



(e) Peppas Sahlin, $R^2 = 0.9915$

Figura C.7: Ajustes matemáticos para el estudio de la cinética de liberación.

Anexo D

Diagrama de Gantt

En la Figura D.1 se muestra el tiempo dedicado a cada fase y a cada experimento de este trabajo, que se ha realizado a lo largo de 9 meses.

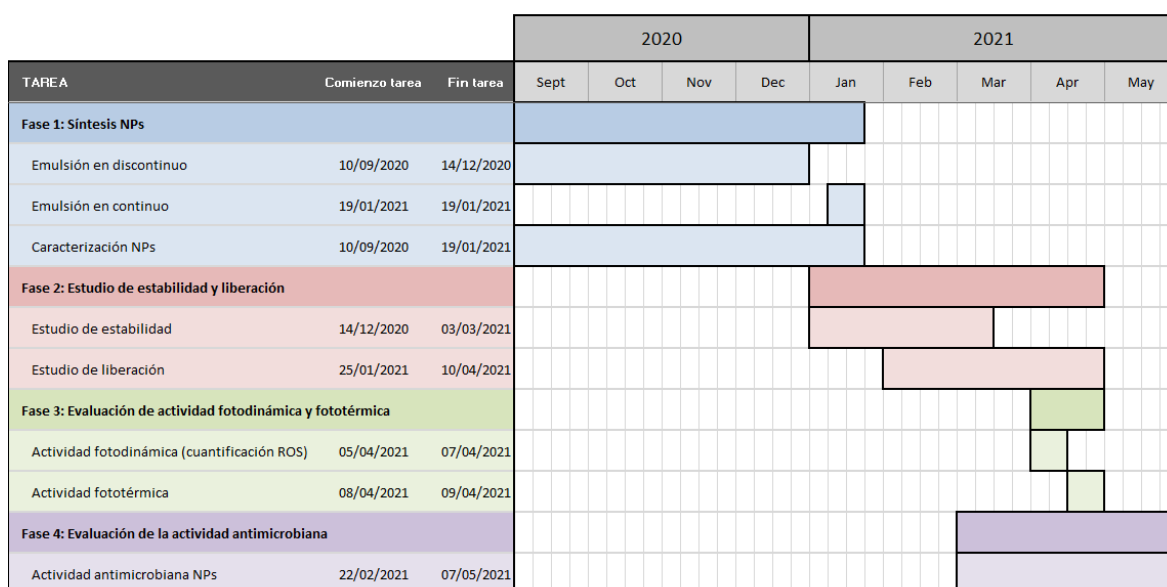


Figura D.1: Diagrama de Gantt