



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Análisis de la influencia de diversos aniones en
biopolímeros para dosificación de fármacos.**

Autor/a:

Daniel Carreño Calzada

Tutor/es/as:

Dr. Israel González de Torre

Dra. Silvia Valverde Bastardo

Año 2023

ÍNDICE

1.	LISTADO DE ABREVIATURAS.....	3
2.	RESUMEN DEL TRABAJO.....	4
	RESUMEN	4
	ABSTRACT	4
3.	INTRODUCCIÓN	6
3.1.	Dosificación de fármacos.....	6
3.2.	Elastina	7
3.3.	Polímeros Tipo Elastina (ELP)	7
3.4.	La naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable de los ELR.....	8
3.5.	Polímero de estudio	10
4.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	12
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1.	Materiales.....	13
5.2.	Instrumentos	15
5.3.	Compuestos.....	16
5.4.	Software	16
5.5.	Métodos	17
5.5.1.	Preparación de las disoluciones	17
5.5.2.	Turbidimetría	17
5.5.2.1.	Preparación de las muestras	18
5.5.2.2.	Medida.....	18
5.5.3.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	19
5.5.3.1.	Preparación de las muestras	20
5.5.3.2.	Medida.....	20
5.5.4.	Dispersión de la luz electroforética (ELS) y Dispersión de luz dinámica (DLS).....	20
5.5.4.1.	Dispersión de la luz electroforética (ELS)	20
5.5.4.2.	Dispersión de luz dinámica (DLS).....	21
5.5.4.3.	Preparación de las muestras	22
5.5.4.4.	Medida.....	22
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1.	Turbidimetría	23
6.2.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	26
6.3.	Zetasizer.....	29
6.3.1.	Tamaño de partícula (DLS).....	29
6.3.2.	Dispersión de la luz electroforética (ELS)	34

7.	CONCLUSIONES.....	38
8.	BIBLIOGRAFÍA	40
9.	LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	43
	TABLAS.....	43
	FIGURAS.....	43
10.	ANEXO	46
	10.1. Turbidimetría	46
	10.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	52
	10.3. Zetasizer: DLS.....	61
	10.4. pH de las muestras.	87
	10.5. S50I60	87
	10.5.1. Tamaño de partícula y Pdi	87
	10.5.2. Potencial z.....	88

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

DLS	Dispersión de luz dinámica
ELS	Dispersión de la luz electroforética
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ELP	Elastin Like Polymers
ELR	Elastin Like Recombinamers
Tt	Temperatura de transición
Pdi	Índice de polidispersidad
mQ	Agua Ultrapura

2. RESUMEN DEL TRABAJO

RESUMEN

Este trabajo, llevado a cabo en las instalaciones del grupo de investigación BIOFORGE, tiene como objetivo observar la variación de la temperatura de transición inversa del recombinámero de elastina S_{50I60} en distintas impurezas (disoluciones acuosas de distintas sales). Dicho polímero se obtiene mediante un proceso de fermentación con bacterias *Escherichia coli* ya modificadas genéticamente para introducir el código de ADN que dará lugar al recombinámero tipo elastina (ELR) deseado.

Se ha estudiado la temperatura de transición del recombinámero de elastina S_{50I60} en diversas impurezas mediante distintos métodos: turbidimetría, dispersión de luz dinámica (DLS), dispersión de la luz electroforética (ELS) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El estudio de la influencia de dichas sales sobre el polímero de interés es muy útil para la dosificación de fármacos, ya que este tipo de polímeros son muy importantes en industria de tejidos, liberación, etc. Con potencial aplicación como es la formación de nanopartículas, hidrogeles o películas. Siendo las nanopartículas especialmente interesantes debido a sus múltiples aplicaciones en biomedicina como nanovacunas, biosensores o administración de fármacos.

ABSTRACT

This work, carried out at the facilities of the research group BIOFORGE, aims to observe the variation of the inverse transition temperature of the elastin-like recombinamer S_{50I60} in different impurities (aqueous solutions of different salts). This polymer is obtained through a fermentation process with genetically modified *Escherichia coli* bacteria to introduce the DNA code that will give rise to the desired Elastin Like Recombinamer (ELR).

The transition temperature of the elastin-like recombinamer S_{50I60} has been studied in various impurities using different methods: turbidimetry, dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS), and differential scanning calorimetry (DSC).

Studying the influence of these salts on the polymer of interest is very useful for drug dosing, as these types of polymers are crucial in the tissue industry, drug release, etc. They have

potential applications such as the formation of nanoparticles, hydrogels, or films, with nanoparticles being particularly interesting due to their multiple biomedical applications such as nanovaccines, biosensors, or drug delivery.

3. INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros son materiales poliméricos o macromoleculares sintetizados por los seres vivos y, por tanto, presentes en ellos. Los tres biopolímeros principales son: proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. También se clasifican como biopolímeros aquellos materiales sintéticos que son biocompatibles con los seres vivos. [1]

En medicina se investigan las aplicaciones de biomateriales derivados de bloques de copolímeros proteicos, en particular los bloques de copolímeros recombinantes de elastina, cuya microestructura se puede modificar y obtener diversas formas como: partículas, películas, geles o fibras [3]. Los nuevos biopolímeros con propiedades innovadoras y avanzadas pueden desempeñar un papel especialmente importante en áreas como la administración controlada de fármacos, la ingeniería de tejidos o en la medicina regenerativa. [4]

3.1. Dosificación de fármacos.

Actualmente, los ELR tienen una importancia muy grande en varios campos de la medicina. Gracias a ellos se han desarrollado varias formas de administrar medicamentos en forma de nano/micropartículas, hidrogeles y películas [3]. Las nanopartículas, por ejemplo, han resultado ser una herramienta esencial para muchas aplicaciones como biosensores o nanovacunas, pero sobre todo en la administración de fármacos ya que mejoran el rendimiento del fármaco, su solubilidad y estabilidad [9]. Otra utilidad hoy en día de los ELR es que al fusionarlos con una proteína de interés se pueden utilizar para: transporte de proteínas farmacéuticas activas, direccionamiento específico de la proteína diana (para el tratamiento del cáncer) o construcción de matrices biomiméticas (en el campo de la medicina regenerativa) [7]. En ingeniería de tejidos los ELR tienen un gran interés ya que podrían proporcionar un entorno físico y bioquímico apropiado para mantener la diferenciación de condrocitos y apoyar la síntesis de matriz de cartílago in vitro [9].

Por tanto, en la actualidad la investigación de este tipo de polímeros (ELR) es muy importante ya que pueden llegar a tener muchas utilidades y beneficios.

3.2. Elastina

La elastina es una proteína distribuida por toda la matriz extracelular animal, como arterias, pulmones, ligamentos elásticos, vejiga y piel [2,5]. Es la principal proteína extensible que permite el estirado reversible de la piel [6].

La elastina está formada por un dominio reticulable hidrofílico rico en residuos de lisina (K) y alanina (A), y un dominio elástico hidrofóbico rico en residuos de valina (V), prolina (P), glicina (G) y alanina. Dicho dominio está formado por una secuencia aminoacídica con regiones gobernadas por motivos repetidos como: VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG [2,5,7,10]. Estos motivos adquieren una estructura que permite que la elastina se deforme sin que se produzcan rupturas, y una vez desaparezca el estrés ésta recupera su conformación original. Cuando la elastina se encuentra en disolución acuosa es capaz de pasar de un estado enrollado (ordenado) a un estado estirado (desordenado) debido a un aumento de T (ver Figura 1).[7]

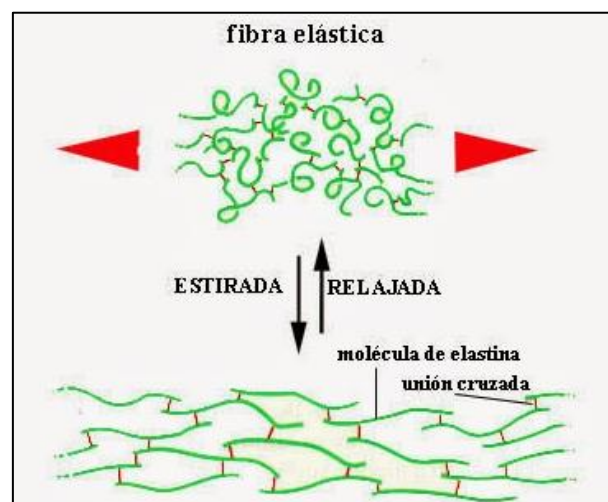


Figura 1. Mecanismo de estiramiento y relajación de la elastina.

3.3. Polímeros Tipo Elastina (ELP)

Los polímeros tipo elastina (ELP, "Elastin Like Polymers") son polipéptidos artificiales cuya secuencia mimetiza los motivos repetidos presentes en la elastina natural. Los ELP más utilizados consisten en repeticiones de la secuencia de aminoácidos $(VPGXG)_n$ donde "X" es cualquier aminoácido excepto prolina, que reduce la capacidad de formar láminas β , y "n" es el número de repeticiones del pentapéptido. [2,7,10]

La naturaleza polimérica y recombinante de los ELP producidos biosintéticamente condujo a una nueva nomenclatura: ELR (Elastin Like Recombinamers) [2,7]. Debido a los avances de las

técnicas en biología molecular es posible introducir un gen en un microorganismo obteniendo el polímero deseado. Este nombre destaca su similitud con la proteína natural elastina, su obtención recombinante y su carácter polimérico. Además, los ELR presentan similitudes con la elastina en aspectos como las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad, la naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable. [7]

3.4. La naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable de los ELR

Como ya se comentó anteriormente, la elastina y, por tanto, los ELR, sufren cambios reversibles entre dos conformaciones [7,19]. Así, los ELR son solubles en agua por debajo de una temperatura determinada, en la que están en un estado hidratado rodeado de clatratos de agua, pero aún así más desordenada que la estructura que tiene por encima de esa temperatura en la que el ELR pasa a un estado más ordenado excluyendo agua. A esta temperatura se la denomina temperatura de transición (T_t) (ver Figura 2). [7]



Figura 2. Estructura clatrato del agua.

Por lo que, por encima de esta T_t las estructuras de clatrato dejan de estar unidas a los residuos apolares debido a la agitación térmica, lo que provoca que, al no estar unidos a los clatratos, la cadena polipeptídica se pliegue hidrofóticamente y pase de una espiral aleatoria a estructuras más cerradas (ver figura 4) que implican giros β de tipo II, es decir, espirales β , constituidas por una sucesión de horquillas β (ver figura 3). [7,9]

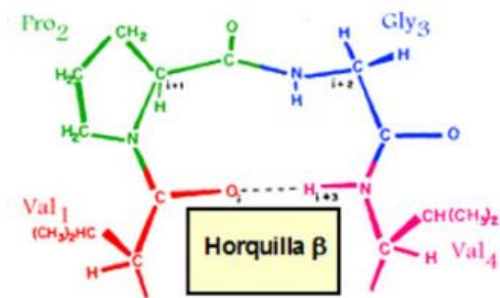


Figura 3. Horquilla β

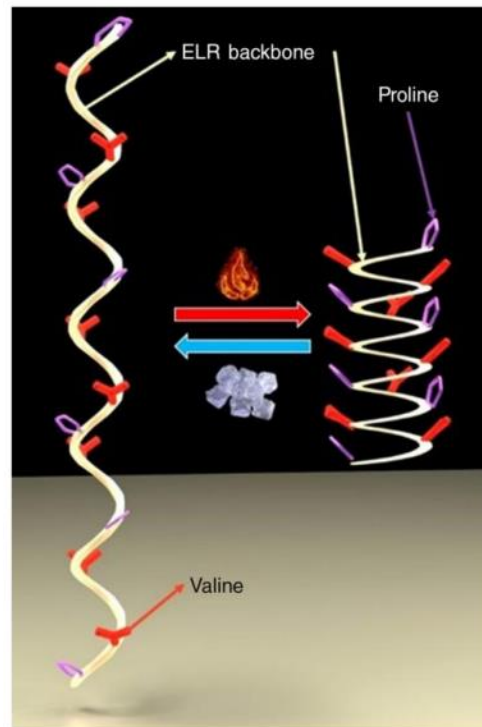
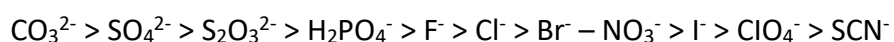


Figura 4. Esquema del cambio conformacional de los polímeros ELR.

El hecho de que al aumentar la T^a los ELR se pliegan hidrofóticamente provoca un aumento en el orden local, el cual es superado por el desorden debido a la ruptura de las estructuras clatrato fruto de la agitación térmica. Este aumento en la entropía es el que provoca que $\Delta G < 0$ y por tanto se produzca de manera espontánea. [7]

La energía térmica necesaria para desencadenar el proceso de transición inversa depende de numerosos factores [9]:

- 1) **Dominios hidrofóbicos y entrecruzados:** se ha demostrado que la T_t disminuye a medida que aumenta el número de dominios hidrofóbicos. También se llegó a la conclusión de que dicha T_t no solo dependía de la polaridad del medio del polímero sino también de la disposición de los aminoácidos a lo largo de la cadena polimérica. [9]
- 2) **Naturaleza y contenido de la sal:** Los efectos provocados por las sales son más pronunciados respecto a los aniones que a los cationes, siguiendo el siguiente orden de influencia:



Los aniones a la izquierda del Cl⁻, incluyendo a este, se conocen como cosmotropos y en solución están fuertemente hidratados. Estos aniones provocan una disminución lineal de la Tt a medida que aumenta la concentración de la sal.

Por otro lado, los aniones de la derecha del Cl⁻ se denominan caotropos y están débilmente hidratados. Estos producen un aumento de la Tt a una concentración de sal baja antes de que el efecto salting-out sea dominante a mayor concentración de sal, disminuyendo así la Tt. [9]

- 3) Concentración de polipéptido:** la concentración del polipéptido está directamente relacionada con la capacidad para autoensamblarse. Pero esta relación no es lineal: a concentraciones de polipéptidos más bajas pequeños cambios en la concentración tienen un gran efecto en la Tt. Cambios similares a altas concentraciones tienen efectos menos marcados. [9]
- 4) Codisolvente:** El uso de alcoholes fluorados como el trifluoroetanol (TFE) y el hexafluoro-2-propanol (HFIP) puede facilitar el autoensamblaje de los ELR. [9]
- 5) pH:** En función del grupo funcional que se encuentre en el residuo huésped (posición X) del polímero (VPGXG)_n y sus características apolares, el pKa de la proteína se verá afectado. Por tanto, mediante el cambio del pH podemos producir un cambio en la polaridad del polímero y por tanto un cambio en la Tt. [9]
- 6) luz:** los polipéptidos que contienen cromóforos experimentan una isomerización fotoinducida, es decir, una fotomodulación entre sus conformaciones cis-trans que provoca su plegamiento y despliegue. Aunque el cambio de polaridad no es grande, provoca un cambio en la Tt significativo. [9]
- 7) Longitud del ELR:** a mayor longitud del ELR mayor número de dominios hidrofóbicos, lo que provoca que la Tt disminuya (como se comentó en la influencia respecto a los dominios hidrofóbicos). [9]

Por tanto, debido a que la Tt se puede ajustar dependiendo de dichos parámetros, como ya se comentó, los ELR son muy importantes en ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos, etc. [9]

3.5. Polímero de estudio

Como ya se comentó, los ELR están formados por el pentapéptido (VPGXG)_n. En este caso, el polímero de estudio se trata del S₅₀I₆₀, lo que quiere decir que nuestro ELR está compuesto

por un bloque en el que el residuo huésped está ocupado por una S (serina) dando lugar a un bloque hidrofílico [(VPGVG)₂(VPGSG)(VPGVG)₂]; y por un bloque donde el residuo huésped está ocupado por una I (isoleucina) obteniendo así un bloque hidrofóbico apolar (VPGIG)₆₀.

La estructura del pentabloque de nuestro polímero es:



Dicho polímero se pliega como ya se comentó en el apartado 3.3, formando micelas (nanopartículas) en las que la parte hidrofóbica del polímero se encuentra en el interior de la micela y la parte hidrofílica en el exterior, en contacto con el agua. Esta característica es muy útil ya que aporta la posibilidad de unirse a fármacos hidrófobos, al superar la Tt del polímero este se plegaría formando una micela en la que el fármaco queda atrapado en su interior. Y cuando la temperatura sea inferior a la Tt las estructuras de las micelas se romperían y liberarían el fármaco.

Tabla 1. Clasificación de aminoácidos.

Aminoácido	Tipo	Abreviatura	Letra	pK _{a1} (-COOH)	pK _{a2} (-NH ₂)	pK _{aR} (R)	pI
Glicina	Neutros apolares	GLI	G	2,34	9,78		6,06
Alanina		ALA	A	2,35	9,69		6,02
Valina		VAL	V	2,32	9,62		5,97
Leucina		LEU	L	2,36	9,64		6,00
Isoleucina		ILE	I	2,36	9,68		6,02
Metionina		MET	M	2,28	9,21		5,75
Prolina		PRO	P	1,99	10,60		6,30
Fenilalanina	Neutros aromáticos	PHE	F	1,83	9,29		5,53
Tirosina		TRY	Y	2,20	9,11	10,07	5,65
Triptófano		TRP	W	2,38	9,39		5,89
Serina	Neutros polares	SER	S	2,21	9,15		5,68
Cisteína		CYS	C	1,96	10,28	8,18	5,07
Treonina		TRE	T	2,71	9,62		6,16
Asparagina		ASG	N	2,02	8,80		5,41
Glutamina		GLN	Q	2,17	9,13		5,65
Ácido aspártico	Ácidos	ASP	D	2,09	9,82	3,86	2,97
Ácido glutámico		GLU	E	2,19	9,67	4,25	3,22
Lisina	Básicos	LYS	K	2,18	8,95	10,53	9,74
Arginina		ARG	R	2,17	9,04	12,48	10,76
Histidina		HIS	H	1,82	9,17	6,00	7,58

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la Tt del polímero S_{50l60} en distintas disoluciones salinas para observar cómo influyen distintos aniones presentes en el cuerpo humano, en concreto: Cl⁻, CO₃⁻², HCO₃⁻, H₂PO₄⁻, HPO₄⁻², PO₄⁻³. Con la finalidad de emplear dicho polímero para dosificación de fármacos.

Para ello se establecerán unos objetivos parciales basados en la preparación de las distintas disoluciones salinas de NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₃PO₄ y se emplearán las técnicas técnicas DSC, ELS, DLS y turbidimetría para el estudio de la Tt.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

- Material de uso común (Pinzas, espátulas, tubos Falcon, Eppendorf, etc).
- Micropipetas de 20-100 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL .
- Crisoles de aluminio de 40 μL .



Figura 5. Fotografía de crisoles de aluminio para DSC.

- Soporte de crisoles.



Figura 6. Fotografía de un soporte de crisoles.

- Cierracrisoles Mettler Toledo.



Figura 7. Fotografía del cierracrisoles.

- Cubetas de plástico de 1 ml



Figura 8. Fotografía de una cubeta de plástico de 1 ml.

- Cubetas de capilar plegado para Zetasizer Nano DT1070.



Figura 9. Fotografía del capilar plegado.

- Estufa.



Figura 10. Fotografía de la Mufla.

5.2. Instrumentos

- Balanza XS105 DualRange Mettler Toledo (precisión $\pm 0,1$ mg)



Figura 11. Fotografía de la microbalanza.

- pHmetro Basic 20+ Crison
- Espectrofotómetro Cary 100 UV-Vis Agilent Technologies



Figura 12. Fotografía del espectrofotómetro.



Figura 13. Fotografía del interior del espectrofotómetro.

- DSC882e Mettler Toledo



Figura 14. Fotografía del DSC



Figura 15. Fotografía del horno del DSC.

- Zetasizer Nano ZSP.



Figura 16. Fotografía del Zetasizer Nano. Figura 17. Fotografía de interior del zetasizer Nano.

5.3. Compuestos

- Polímero S_{50l60} (producción de Bioforge).
- Cloruro sódico (NaCl)
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)
- Bifosfato de sodio (NaH₂PO₄) (Casa comercial: Scharlau)
- Fosfato disódico (Na₂HPO₄)
- Fosfato de sodio (Na₃PO₄)
- Agua mQ

(El resto de compuesto se adquirieron de la casa comercial: Sigma Aldrich).

5.4. Software

- Word
- Excel
- StatgraphHics
- Thermal
- METTLER STARe
- Zetasizer Software

5.5. Métodos

5.5.1. Preparación de las disoluciones

Para la preparación de las disoluciones salinas se tuvo en cuenta la presión osmótica a la hora de calcular la concentración de dichas disoluciones. Por tanto, se calculó la presión osmótica a partir de la ecuación:

$$\pi = icRT$$

Donde T es la Tª del cuerpo humano (37º), R la constante de los gases ideales en atm*L/K*mol, i es el número de especies en disolución, c es la concentración y π es la presión osmótica.

Se tomó de referencia la concentración del suero salino (9 g/L de NaCl) para calcular la presión osmótica en el cuerpo humano obteniendo: $\pi = 7,829$ atm.

Una vez calculada la presión osmótica se pudo calcular la concentración de cada disolución y los mg de sal necesarios para hacer una disolución de 10 ml de cada una de ellas.

Tabla 2. Datos disoluciones salinas

Sal	Concentración (mol/L)	Mg de sal/10 ml de agua mQ
NaCl	0,154	89,998
Na₂CO₃	0,103	294,590
NaHCO₃	0,103	146,219
Na₂HPO₄	0,154	129,375
NaH₂PO₄	0,154	212,505
Na₃PO₄	0,077	126,234

5.5.2. Turbidimetría

Un haz de luz, generado por una fuente, incide con una longitud de onda determinada en una cubeta que contiene la sustancia a medir, midiendo la intensidad de la radiación lumínica antes y después de atravesar el medio. Se observa una disminución en la intensidad debido a la dispersión de las partículas que se encuentran en la muestra. [13,20]

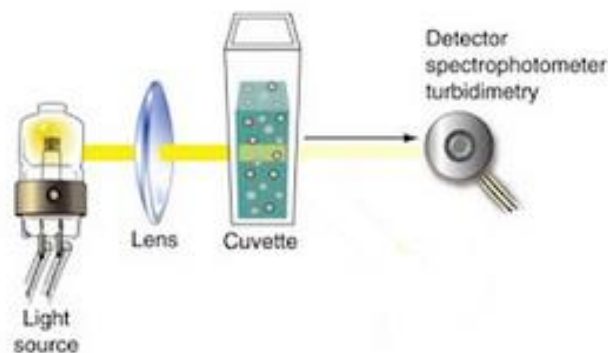


Figura 18. Esquema turbidimetría y sus componentes.

5.5.2.1. Preparación de las muestras

La concentración de las muestras es de 5mg/ml, por lo que se pesa la cantidad necesaria de polímero para alcanzar dicha concentración en aproximadamente 3ml de disolución salina y poder calcular así la media.

Las disoluciones preparadas se enfrían en un frigorífico a 4°C ó 5°C durante mínimo 1h para que el polímero se disuelva completamente.

5.5.2.2. Medida

Se procede a encender el equipo, se configura el software Thermal para que el haz de luz incida en la muestra con una $\lambda=350$ nm. La temperatura inicial será 5°C e irá aumentando hasta una temperatura final de 45°C a una velocidad de 1°C/min.

Una vez configurado el software, se realiza una medición de cada disolución salina para comprobar que su absorbancia es 0 a esa longitud de onda y no nos interfieren en las medidas. Se comprobó que, efectivamente, no absorbían a esa longitud de onda y, por tanto, el blanco a realizar solo era necesario con agua mQ.

A continuación, se introducen 1 ml de cada muestra en una cubeta de 1 ml de capacidad. Se aprecia que la disolución es transparente y a medida que aumente la temperatura se formarán nanopartículas responsables de la dispersión de la luz y al final se observará una disolución que presenta turbidez.

Por último, en las gráficas obtenidas se calcula la primera derivada obteniendo así el valor exacto de la Tt de cada muestra.

5.5.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En DSC se miden las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado [12].

Existen dos tipos de calorimetría diferencial de Barrido:

- **DSC de potencia compensada:** la muestra y el material de referencia se encuentran separados en dos hornos independientes, aunque sus temperaturas se mantienen iguales mientras aumentan linealmente.[12]

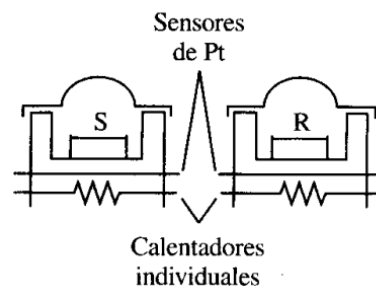


Figura 19. Soporte de muestra y hornos de un DSC de potencia compensada

- **DSC de flujo de calor:** es el utilizado en este caso y se diferencia del anterior en que la muestra y el material de referencia se encuentran en el mismo horno. El calor fluye tanto hacia la muestra como a la referencia a través de un disco termoelectrico de constantan calentado eléctricamente. La diferencia entre el flujo de calor hacia la muestra y hacia la referencia se controla mediante unos termopares.[12]

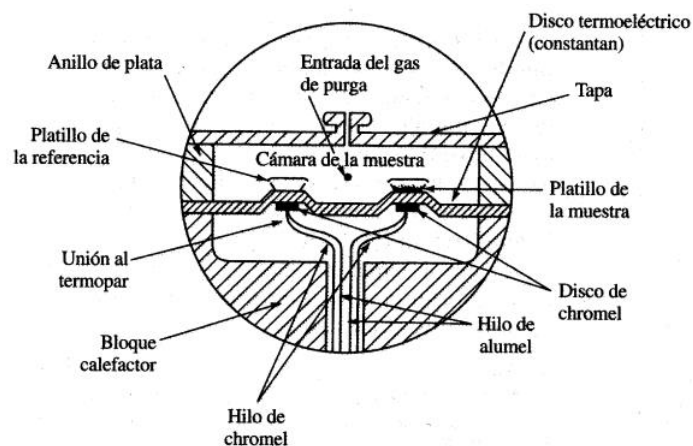


Figura 20. Soporte de muestras y horno de un DSC de flujo de calor.

5.5.3.1. Preparación de las muestras

La concentración de las muestras es de 50 mg/ml, por lo que se pesa la cantidad necesaria de polímero para alcanzar dicha concentración en aproximadamente 200 μ L de disolución salina.

Las disoluciones preparadas se enfrían en un frigorífico a 4°C ó 5°C durante mínimo 1h para que el polímero se disuelva completamente.

5.5.3.2. Medida

En primer lugar, se pesan aproximadamente 20 μ L de referencia (disolución salina correspondiente en cada caso) en un crisol de aluminio, se apunta el peso exacto y se cierra herméticamente con el cierracrisoles. Después se pesan aproximadamente los mismos mg de muestra y se cierran los crisoles de la misma forma que la referencia.

Una vez encendido el equipo se controla mediante un ordenador a través del software METTLER STARE. Se configura de modo que, al introducir la muestra y la referencia, y comenzar la medida, el equipo se mantenga a 0°C durante 5 min para estabilizar la muestra y, posteriormente, la temperatura aumente de 0°C a 60°C a una velocidad de 5°C/min.

Una vez realizada la medida se obtiene un diagrama en el que se observa un pico, se realiza la integral del área del pico y se obtiene así el valor de la temperatura de transición. Se realiza la media de las medidas realizadas obteniendo las Tt de cada muestra.

5.5.4. Dispersión de la luz electroforética (ELS) y Dispersión de luz dinámica (DLS)

El instrumento utilizado es el Zetasizer Nano ZSP y se utiliza para mediciones del tamaño, movilidad electroforética de proteínas, potencial zeta de nanopartículas y superficies, y opcionalmente, para microreología de soluciones de proteínas y polímeros. [14]

En este caso, se ha empleado para medir el tamaño de partícula (DLS) y el potencial Z de nuestro polímero (ELS).

5.5.4.1. Dispersión de la luz electroforética (ELS)

La dispersión de luz electroforética mide la desviación Doppler causada por una partícula que es movida electroforéticamente. [22]

Se basa en el principio de la electroforesis: en una celda que contienen dos electrodos se aplica un campo eléctrico que hace que las partículas alcancen una velocidad que se conoce

como velocidad electroforética (ecuación 1), que está relacionada con su potencial zeta. [15,22]

$$U = \mu E \quad (1)$$

Donde “U” es la velocidad electroforética, “μ” es la movilidad electroforética y “E” el campo eléctrico.

La muestra que está entre los electrodos es iluminada con un rayo láser y la dispersión de dicho láser se usa para determinar la desviación Doppler causada por el movimiento de las partículas. Conociendo la desviación Doppler se puede calcular la movilidad electroforética mediante la ecuación 2 y posteriormente, con la aproximación de Smoluchowski se obtiene el potencial zeta (ecuación 3). [15,22]

$$\mu = (\lambda_0/n \sin \theta)(1/E)\Delta\nu \quad (2)$$

Donde “λ₀” es la longitud de onda del láser, “n” el índice de refracción, “θ” el ángulo al cual la luz dispersada es detectada, “E” el campo eléctrico y “Δν” la desviación de la frecuencia Doppler. [22]

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\epsilon} \quad (3)$$

Donde “ζ” es el potencial zeta, “η” la viscosidad del fluido y “ε” la constante dieléctrica. [22]

5.5.4.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Es una técnica no invasiva que se utiliza para medir el tamaño y la distribución de tamaño de moléculas y partículas normalmente en el intervalo de 10 a 100 nm [16]. Cuando un haz de luz monocromático encuentra una solución que contiene macromoléculas, la luz se dispersa en todas las direcciones en función del tamaño y la forma de las macromoléculas. [21]

En definición, la dispersión de luz dinámica, también conocida como espectroscopia de correlación de fotones es una técnica que mide el movimiento browniano de las macromoléculas en una solución, y relaciona este movimiento con el tamaño de las partículas. Dicho movimiento de las macromoléculas depende de su tamaño, temperatura y viscosidad del solvente [21]. Por ejemplo, se puede determinar la distribución del tamaño de partícula debido a que las partículas pequeñas se mueven más rápido que las partículas grandes, y generan fluctuaciones rápidas en la intensidad de la dispersión de luz. [16]

Para el tamaño de partícula también se obtiene el índice de polidispersidad (pdi) que nos indica la amplitud de la distribución de los pesos moleculares de un polímero [17,18] y es adimensional [18]. Los valores del índice de polidispersidad próximos a la unidad presentan una gran homogeneidad de pesos moleculares. Por otro lado, si los valores son mucho mayores de la unidad habrá una gran dispersión de pesos moleculares. [17]

5.5.4.3. Preparación de las muestras

La concentración de las muestras es de 5mg/ml, por lo que se pesa la cantidad necesaria de polímero para alcanzar dicha concentración en aproximadamente 3ml de disolución salina.

Las disoluciones preparadas se enfrían en un frigorífico a 4°C ó 5°C durante mínimo 1h para que el polímero se disuelva completamente. Cuando el polímero este completamente disuelto se introducen las muestras durante 1 día en la estufa a 37°C para que se formen todas las nanopartículas.

5.5.4.4. Medida

Las medidas del tamaño de partícula y del potencial z se pueden realizar seguidas para una misma muestra, por lo que se configura el programa para las mediciones de DLS y ELS: se establece la temperatura de medición en 40°C con una estabilización previa a dicha temperatura de 2 min de duración.

Por último, se introduce la muestra en una cubeta de capilar plegado, se introduce en el equipo y se realizan en primer lugar las medidas del tamaño de partícula y seguidamente las de potencial z.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Turbidimetría

Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó la media obteniendo así la Tt del polímero en las distintas disoluciones salinas. A continuación, se muestra la representación para la muestra: NaCl + S_{50I60} (los demás resultados están representados en el anexo 10.1).

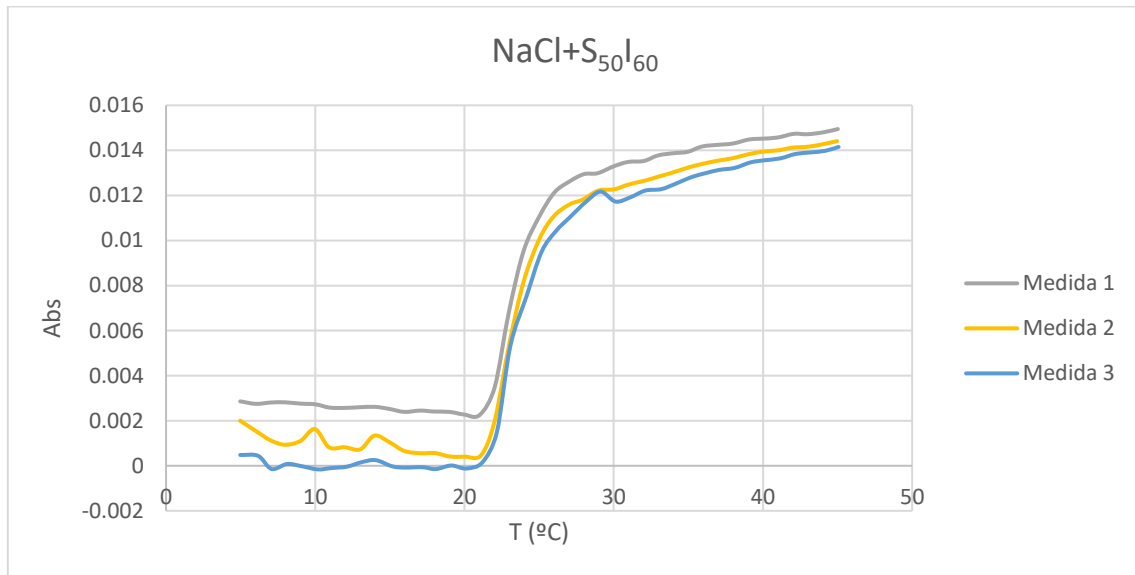


Figura 21. Representación de las medidas 1, 2 y 3 de la muestra NaCl + S_{50I60} en turbidimetría.



Figura 22. Representación de la primera derivada de la medida 1 de la muestra NaCl + S_{50I60} en turbidimetría.

Como se aprecia en las representaciones la Tt se corresponde con el punto medio de la sigmoide, que es el mismo valor que se obtiene al realizar la primera derivada. En la tabla 3 se representan las medias y las Tt para cada muestra.

Tabla 3. Resultados obtenidos en turbidimetría.

Muestra	Tt media (°C)	Desviación estandar
NaCl + S50I60	22.97	± 0.00
Na₂CO₃ + S50I60	16.72	± 0.48
NaHCO₃ + S50I60	21.09	± 0.08
Na₂HPO₄ + S50I60	16.25	± 0.10
NaH₂PO₄ + S50I60	17.40	± 0.10
Na₃PO₄ + S50I60	16.04	± 0.03

En la figura 23, se representa la Tt media de cada muestra y su desviación estándar:

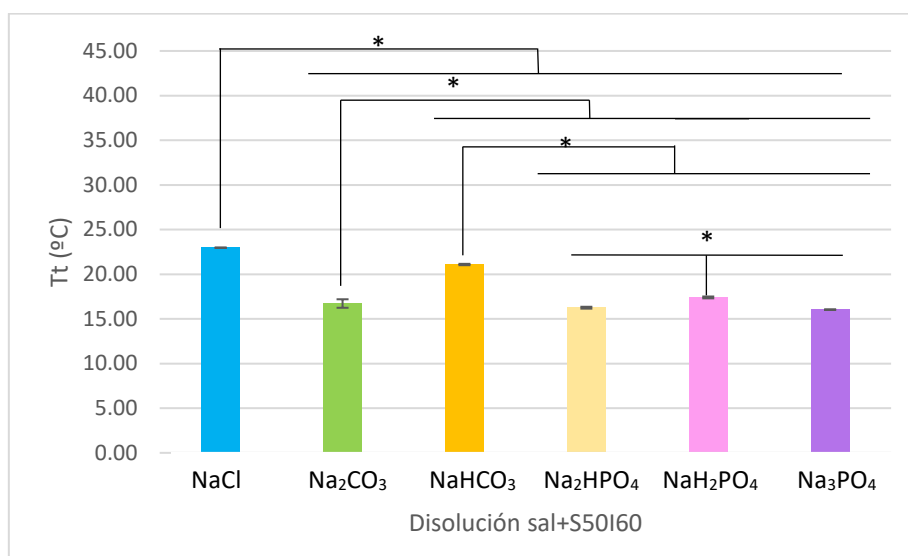


Figura 23. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra. * indica que presentan diferencias significativas.

A continuación, se realiza un ANOVA de una vía para comprobar qué condiciones ofrecen una diferencia significativa:

Tabla 4. Tabla ANOVA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	126.335	5	25.2669	592.58	0
Intra grupos	0.511667	12	0.0426389		
Total (Corr.)	126.846	17			

Como el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Tt entre una muestra y otra, con un nivel del 5% de significación. Para comprobar cuales son aquellas medias cuyas diferencias son significativas se realiza la prueba de múltiples rangos.

Tabla 5. Comparación de grupos homogéneos.

Sales	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Na ₃ PO ₄	3	16.0367	X
Na ₂ HPO ₄	3	16.2533	X
Na ₂ CO ₃	3	16.72	X
NaH ₂ PO ₄	3	17.4033	X
NaHCO ₃	3	21.0867	X
NaCl	3	22.97	X

Tabla 6. Homogeneidad entre muestras.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Na ₂ CO ₃ - Na ₂ HPO ₄	*	0.466667	0.367348
Na ₂ CO ₃ - Na ₃ PO ₄	*	0.683333	0.367348
Na ₂ CO ₃ - NaCl	*	-6.25	0.367348
Na ₂ CO ₃ - NaH ₂ PO ₄	*	-0.683333	0.367348
Na ₂ CO ₃ - NaHCO ₃	*	-4.36667	0.367348
Na ₂ HPO ₄ - Na ₃ PO ₄		0.216667	0.367348
Na ₂ HPO ₄ - NaCl	*	-6.71667	0.367348
Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	-1.15	0.367348
Na ₂ HPO ₄ - NaHCO ₃	*	-4.83333	0.367348
Na ₃ PO ₄ - NaCl	*	-6.93333	0.367348
Na ₃ PO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	-1.36667	0.367348
Na ₃ PO ₄ - NaHCO ₃	*	-5.05	0.367348
NaCl - NaH ₂ PO ₄	*	5.56667	0.367348
NaCl - NaHCO ₃	*	1.88333	0.367348
NaH ₂ PO ₄ - NaHCO ₃	*	-3.68333	0.367348

* indica una diferencia significativa

Como se observa, todas las muestras presentan una diferencia significativa a excepción de las muestras que contienen las sales Na₃PO₄ y Na₂HPO₄ que como se ve en las tablas 5 y 6 no presentan diferencias significativas. A continuación, se representa el gráfico de medias en el cual también se aprecian estas diferencias.

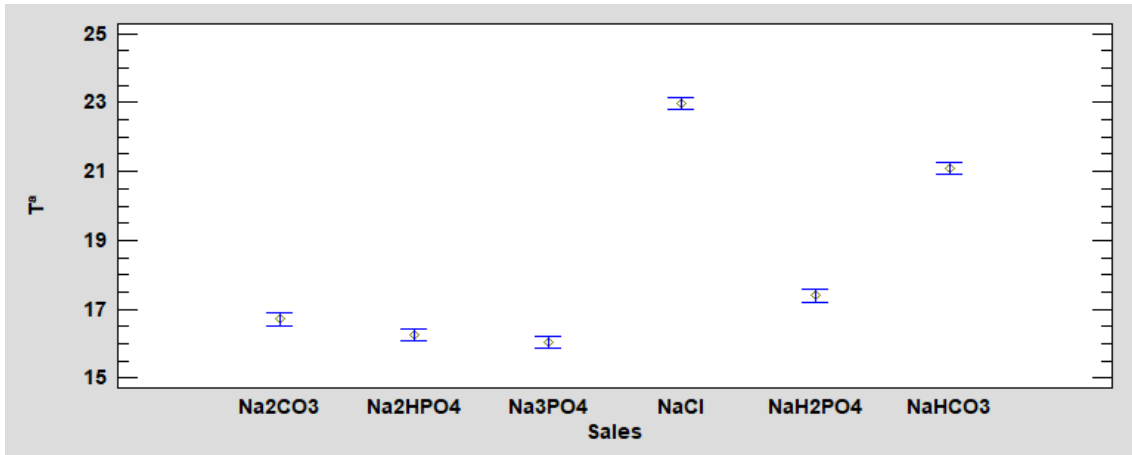


Figura 24. Gráfico de medias.

Por tanto, respecto al estudio realizado mediante turbidimetría, podemos confirmar que el polímero disuelto en Na_2HPO_4 y Na_3PO_4 dan una T_t sin diferencias significativas y son los que más disminuyen la temperatura de transición, mientras que la T_t del resto de muestras presentan diferencias significativas entre sí. La sal que menos reduce la T_t es el NaCl.

6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se calcula la media de las tres medidas realizadas para cada muestra obteniendo así la T_t para cada una de ellas. Se muestra a continuación el gráfico correspondiente a las tres medidas realizadas de la muestra del polímero $S_{50|60}$ disuelto en NaCl (el resto de los gráficos se encuentran en el anexo 10.2)

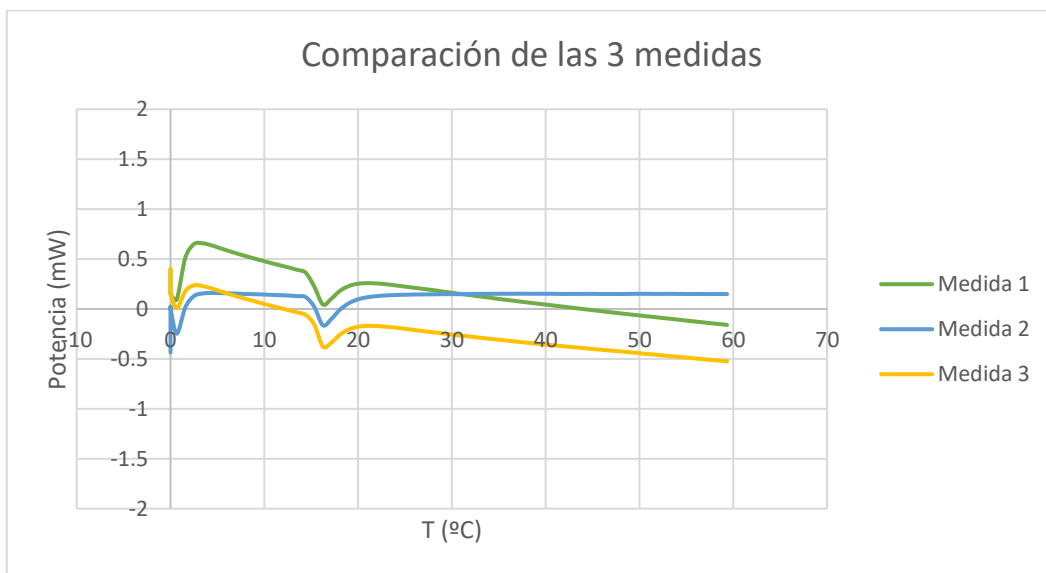


Figura 25. Gráfico del DSC de las tres medidas realizadas para la muestra $S_{50|60} + \text{NaCl}$

Como se puede observar en la figura 25, primero, a la T^a de 0°C , se observa un pico correspondiente a al cambio de fase del agua de sólido a líquido. Posteriormente se encuentra el pico correspondiente a la T_t de nuestro polímero. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras.

Tabla 7. Resultados obtenidos en DSC.

Muestra	T_t media ($^{\circ}\text{C}$)	Desviación estandar
NaCl + S50I60	16.27	± 0.04
Na₂CO₃ + S50I60	10.84	± 0.01
NaHCO₃ + S50I60	14.44	± 0.05
Na₂HPO₄ + S50I60	10.78	± 0.05
NaH₂PO₄ + S50I60	11.66	± 0.00
Na₃PO₄ + S50I60	10.86	± 0.10

En la figura 26, se representa la T_t media de cada muestra y su desviación estándar:

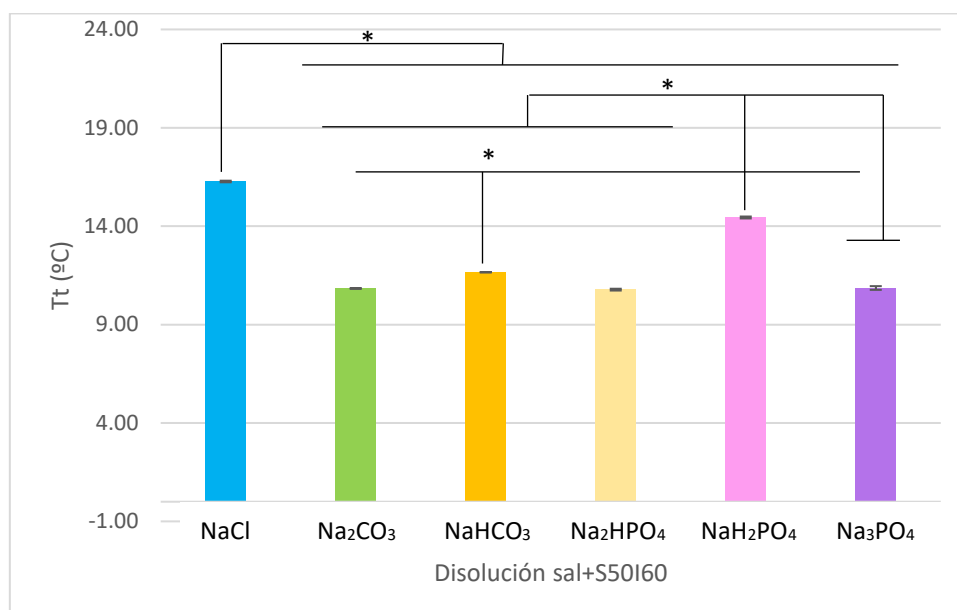


Figura 26. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra. * indica que presentan diferencias significativas.

A continuación, se realiza un ANOVA de una vía para comprobar qué T_t tienen una diferencia significativa:

Tabla 8. Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	81.4278	5	16.2856	6372.61	0
Intra grupos	0.0306667	12	0.00255556		
Total (Corr.)	81.4585	17			

Como el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Tt entre una muestra y otra, con un nivel del 5% de significación. Para comprobar cuales son aquellas medias cuyas diferencias son significativas se realiza la prueba de múltiples rangos.

Tabla 9. Comparación de grupos homogéneos.

Sales	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Na ₂ HPO ₄	3	10.7767	X
Na ₂ CO ₃	3	10.8367	X
Na ₃ PO ₄	3	10.86	X
NaHCO ₃	3	11.66	X
NaH ₂ PO ₄	3	14.4433	X
NaCl	3	16.2733	X

Tabla 10. Homogeneidad entre muestras.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Na ₂ CO ₃ - Na ₂ HPO ₄		0.06	0.0899328
Na ₂ CO ₃ - Na ₃ PO ₄		-0.0233333	0.0899328
Na ₂ CO ₃ - NaCl	*	-5.43667	0.0899328
Na ₂ CO ₃ - NaH ₂ PO ₄	*	-3.60667	0.0899328
Na ₂ CO ₃ - NaHCO ₃	*	-0.823333	0.0899328
Na ₂ HPO ₄ - Na ₃ PO ₄		-0.0833333	0.0899328
Na ₂ HPO ₄ - NaCl	*	-5.49667	0.0899328
Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	-3.66667	0.0899328
Na ₂ HPO ₄ - NaHCO ₃	*	-0.883333	0.0899328
Na ₃ PO ₄ - NaCl	*	-5.41333	0.0899328
Na ₃ PO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	-3.58333	0.0899328
Na ₃ PO ₄ - NaHCO ₃	*	-0.8	0.0899328
NaCl - NaH ₂ PO ₄	*	1.83	0.0899328
NaCl - NaHCO ₃	*	4.61333	0.0899328
NaH ₂ PO ₄ - NaHCO ₃	*	2.78333	0.0899328

* indica una diferencia significativa

Como se observa, todas las muestras presentan una diferencia significativa a excepción de tres muestras: aquellas que contienen las sales Na₃PO₄ y Na₂HPO₄ y Na₂CO₃ que como se ve en las tablas 12 y 13 no presentan diferencias significativas. A continuación, se representa el gráfico de medias en el cual también se aprecian estas diferencias.

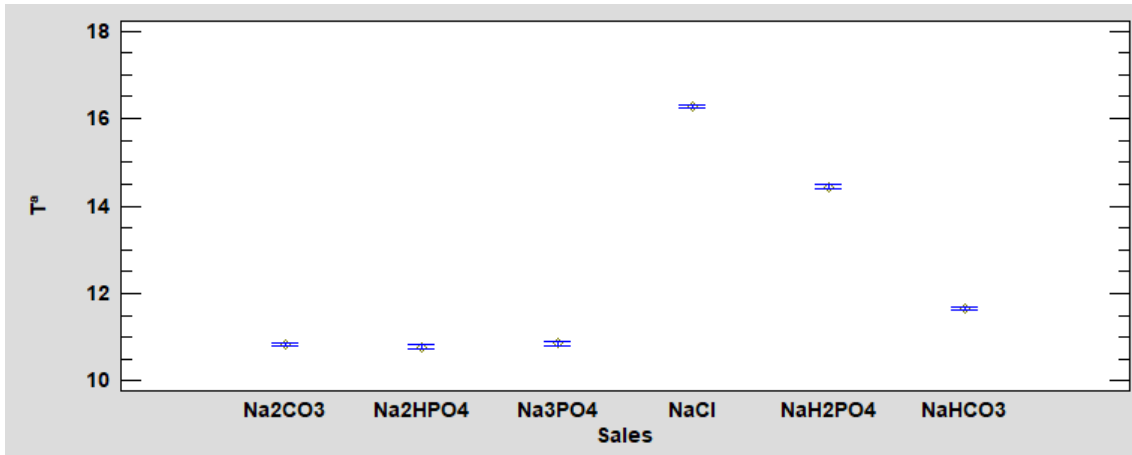


Figura 27. Gráfico de medias.

Por tanto, respecto al estudio realizado mediante calorimetría diferencial de barrido, podemos confirmar que al igual que en los datos obtenidos en turbidimetría el polímero disuelto en Na_2HPO_4 y Na_3PO_4 presenta una T_t sin diferencias significativas. También se observa que mediante DSC el polímero en Na_2CO_3 presenta una T_t sin diferencias significativas respecto a las del polímero en Na_2HPO_4 y Na_3PO_4 y como se observa, estas tres sales son las que más disminuyen la T_t . Por otro lado, la T_t del resto de muestras presentan diferencias significativas entre sí, siendo la sal de NaCl la que menos disminuye la T_t .

6.3. Zetasizer

6.3.1. Tamaño de partícula (DLS)

Se realizan tres medidas de cada muestra a 40°C y se calcula la media del tamaño de partícula. En cada medida se obtienen tres tipos de gráficos:

- **Volumen frente a tamaño de partícula.**

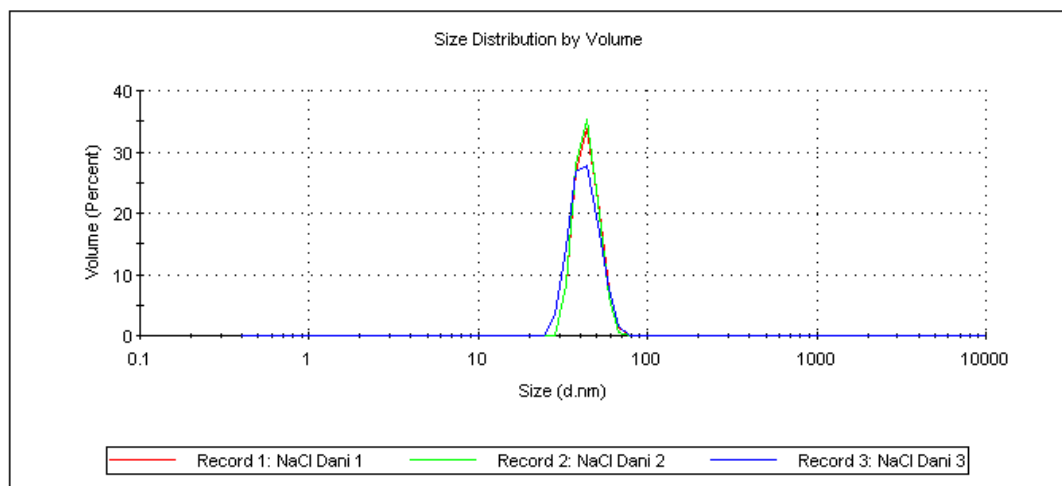


Figura 28. Volumen frente al tamaño de partícula de la muestra S50I60 + NaCl (medida 1).

- **Intensidad frente a tamaño de partícula**

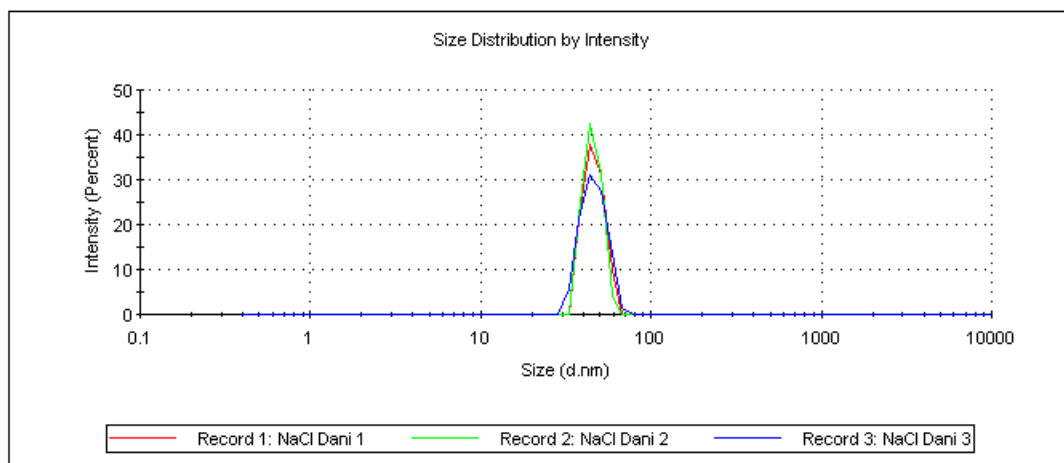


Figura 29. Intensidad frente a tamaño de partícula de la muestra S50I60 + NaCl (media 1).

- **Correlograma:** coeficiente de correlación del tamaño de partícula en función del tiempo.

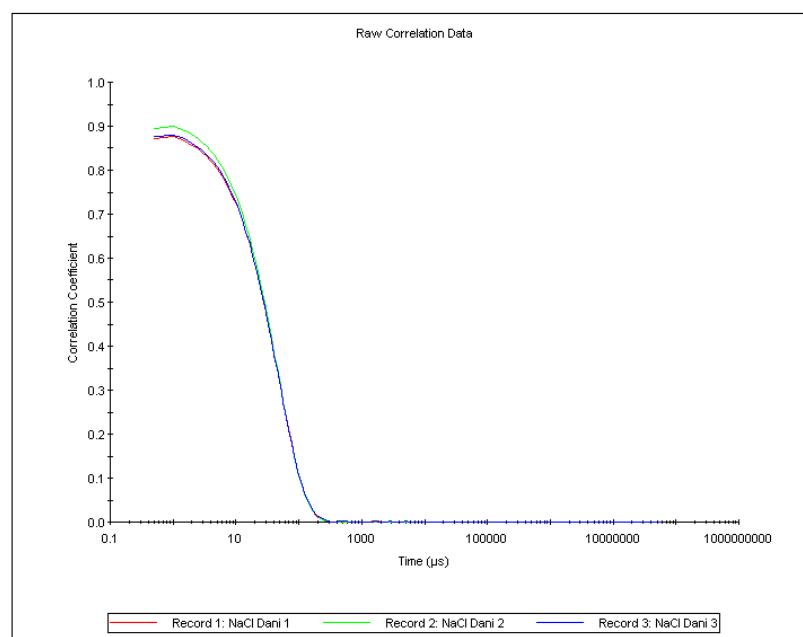


Figura 30. Coeficiente de correlación del tamaño de partícula frente al tiempo de la muestra S50I60 + NaCl (medida 1).

En las figuras 28, 29 y 30 se observa una única banda lo que demuestra que para la muestra S_{50I60} + NaCl a 40°C el tamaño de las partículas es homogéneo por lo que se han formado todas las nanopartículas tipo micelas. (El resto de los gráficos se encuentran en el anexo 10.3).

Para comprobar que había dado tiempo a que se formasen todas las partículas se realizó una medida de cada muestra estando durante un día a 37°C. Se comprobó que los tamaños de partícula sin estar previamente a 37°C y las calentadas previamente a 37°C eran muy similares excepto la muestra Na₃PO₄ + S50I60.

Tabla 11. Comparación de tamaño de partículas en el tiempo.

Muestra	Tamaño de partícula/nm (sin calentar previamente)	Tamaño de partícula/nm (calentada 1 día a 37°C)
NaCl + S50I60	43.89	45.54
Na ₂ CO ₃ + S50I60	26.99	31.78
NaHCO ₃ + S50I60	26.72	26.59
Na ₂ HPO ₄ + S50I60	27.40	33.28
NaH ₂ PO ₄ + S50I60	29.06	28.38
Na ₃ PO ₄ + S50I60	27.97	110.37

Se observó que el tamaño de partícula de la muestra S_{50I60} + Na₃PO₄ seguía aumentando cuanto más tiempo se mantenía a 37°C. En la tabla 12 se muestra la evolución del tamaño de partícula para dicha muestra hasta su estabilización.

Tabla 12. Evolución del tamaño de partícula de la muestra S50I60 + Na₃PO₄.

Días en la estufa	0	1	2	5	7	8	9	10
Tamaño de partícula/nm	27.97	110.37	185.30	254.53	279.13	289.23	293.20	283.97

En las tablas 13 y 14 se encuentran los resultados obtenidos para el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (pdi).

Tabla 13. Resultados obtenidos en para el tamaño de partícula.

Muestra	Tamaño de partícula medio(nm)	Desviación estandar
NaCl + S _{50I60}	43.89	± 0.25
Na ₂ CO ₃ + S _{50I60}	26.99	± 0.47
NaHCO ₃ + S _{50I60}	26.72	± 0.41
Na ₂ HPO ₄ + S _{50I60}	27.40	± 0.07
NaH ₂ PO ₄ + S _{50I60}	29.06	± 0.55
Na ₃ PO ₄ + S _{50I60}	293.11	± 2.20

Tabla 14. Índice de polidispersidad de cada muestra.

Muestra	pdi medio	Desviación estandar
NaCl + S _{50I60}	0.03	± 0.02
Na ₂ CO ₃ + S _{50I60}	0.03	± 0.01
NaHCO ₃ + S _{50I60}	0.02	± 0.01
Na ₂ HPO ₄ + S _{50I60}	0.03	± 0.01
NaH ₂ PO ₄ + S _{50I60}	0.03	± 0.01
Na ₃ PO ₄ + S _{50I60}	0.09	± 0.01

En la tabla 14 podemos comprobar que los pdi de todas las muestras son muy próximos a 0, lo cual indica que las partículas medidas en cada caso son del mismo tamaño.

En la figura 31, se representa el tamaño de partícula medio de cada muestra y su desviación estándar:

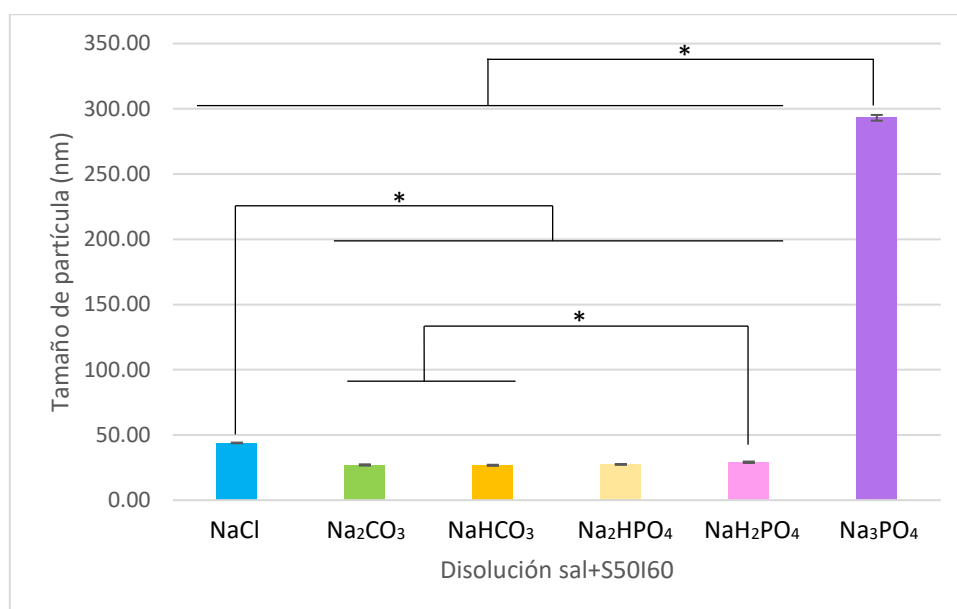


Figura 31. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra. * indica que presentan diferencias significativas.

A continuación, se realiza un ANOVA de una vía para comprobar qué tamaños de partícula tienen una diferencia significativa:

Tabla 15. Tabla ANOVA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	172659	5	34531.8	36919.27	0
Intra grupos	11.224	12	0.935333		
Total (Corr.)	172670	17			

Como el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Tt entre una muestra y otra, con un nivel del 5% de significación. Para comprobar cuales son aquellas medias cuyas diferencias son significativas se realiza la prueba de múltiples rangos.

Tabla 16. Comparación de grupos homogéneos.

Sales	Casos	Media	Grupos Homogéneos
NaHCO ₃	3	26.7167	X
Na ₂ CO ₃	3	26.99	X
Na ₂ HPO ₄	3	27.3933	XX
NaH ₂ PO ₄	3	29.06	X
NaCl	3	43.89	X
Na ₃ PO ₄	3	293.113	X

Tabla 17. Homogeneidad entre muestras.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Na ₂ CO ₃ - Na ₂ HPO ₄		-0.403333	1.72052
Na ₂ CO ₃ - Na ₃ PO ₄	*	-266.123	1.72052
Na ₂ CO ₃ - NaCl	*	-16.9	1.72052
Na ₂ CO ₃ - NaH ₂ PO ₄	*	-2.07	1.72052
Na ₂ CO ₃ - NaHCO ₃		0.273333	1.72052
Na ₂ HPO ₄ - Na ₃ PO ₄	*	-265.72	1.72052
Na ₂ HPO ₄ - NaCl	*	-16.4967	1.72052
Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄		-1.66667	1.72052
Na ₂ HPO ₄ - NaHCO ₃		0.676667	1.72052
Na ₃ PO ₄ - NaCl	*	249.223	1.72052
Na ₃ PO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	264.053	1.72052
Na ₃ PO ₄ - NaHCO ₃	*	266.397	1.72052
NaCl - NaH ₂ PO ₄	*	14.83	1.72052
NaCl - NaHCO ₃	*	17.1733	1.72052
NaH ₂ PO ₄ - NaHCO ₃	*	2.34333	1.72052

* indica una diferencia significativa

A continuación, se representa el gráfico de medias en el cual también se aprecian estas diferencias.

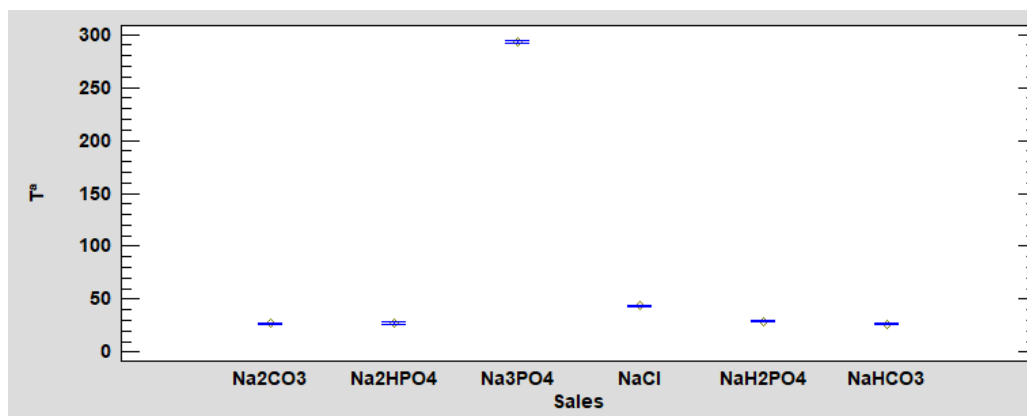


Figura 32. Gráfico de medias.

Por tanto, se observa que las muestras con un tamaño de partícula sin diferencias significativas entre sí son: NaHCO₃, Na₂CO₃ y Na₂HPO₄, por un lado, y Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ por el otro. Las muestras en las que el polímero está disuelto en NaCl y en Na₃PO₄ tienen diferencias significativas respecto a las otras muestras. Como se observa, el polímero disuelto en Na₃PO₄ forma nanopartículas muy grandes por lo que podrá retener fármacos más grandes, pero a su vez será más difícil que se introduzcan en las células. Por otro lado, el resto de las muestras forman nanopartículas más pequeñas por lo que podrán encapsular fármacos más pequeños, pero será más fácil su introducción en las células.

6.3.2. Dispersión de la luz electroforética (ELS)

Se realizan tres medidas a 40°C y se hace la media obteniendo así el potencial z de cada muestra. En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos excepto para la muestra que contiene la sal NaH₂PO₄ que se muestra en la tabla 23 ya que se obtenían valores muy distintos.

Tabla 18. Resultados obtenidos en ELS (potencial zeta).

Muestra	Potencial z medio (mV)	Desviación estándar
NaCl + S _{50l60}	-1736.67	± 661.67
Na ₂ CO ₃ + S _{50l60}	-3855.56	± 393.45
NaHCO ₃ + S _{50l60}	-5401.11	± 954.27
Na ₂ HPO ₄ + S _{50l60}	-3133.33	± 626.60
Na ₃ PO ₄ + S _{50l60}	-21377.78	± 1736.00

Como se observa en la tabla 18, los potenciales z son negativos debido a que los aniones se adhieren a la superficie de las nanopartículas dotándolas de valores negativos. Además, se

observa que el potencial z de la muestra $\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{S}_{50\text{l}60}$ es muy grande, lo cual se debe a su gran tamaño de partícula.

La muestra $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{S}_{50\text{l}60}$ dio resultados más diversos respecto al resto de muestras, obteniéndose potenciales tanto negativos como positivos. Por ello, se realizaron varias medidas para comprobar si en algún momento el potencial z era completamente negativo, pero se obtuvieron potenciales diversos en cada medida. En total se realizaron 11 medidas obteniendo como valor medio de potencial z: 34.87 mV; y una desviación estándar: ± 420.57 .

El valor de la desviación estándar es demasiado grande debido a que las medidas obtenidas varían entre valores positivos y negativos. Como se aprecia, el resultado es un potencial bastante pequeño en comparación con el resto de las muestras y más próximo a 0 incluso habiendo alguna de valor positivo, lo que significa que las partículas formadas en este caso tienen menor carga superficial negativa.

En la figura 33, se representa el tamaño de partícula medio de cada muestra y su desviación estándar:

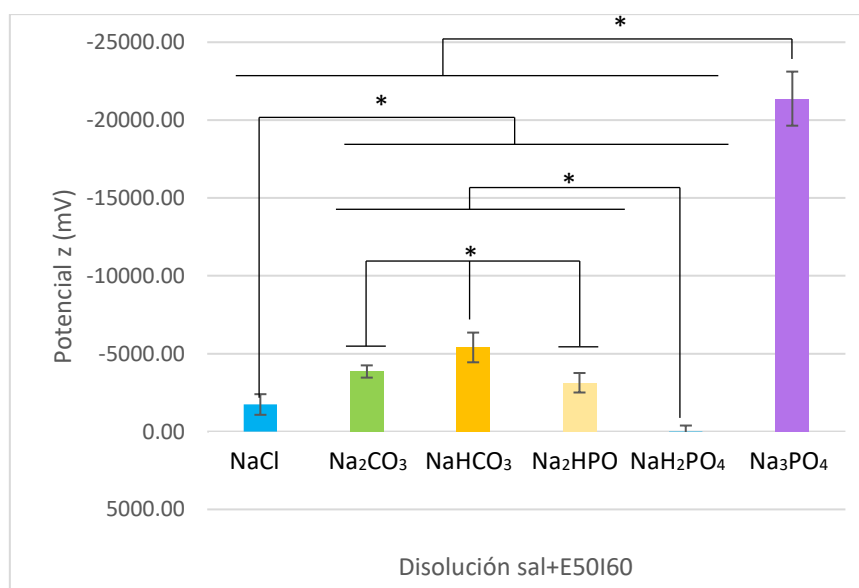


Figura 33. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra. * indica que presentan diferencias significativas.

A continuación, se realiza un ANOVA de una vía para comprobar qué tamaños de partícula tienen una diferencia significativa.

Tabla 19. Tabla ANOVA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.11E+09	5	2.22E+08	382.62	0
Intra grupos	1.16E+07	20	579397		
Total (Corr.)	1.12E+09	25			

Como el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Tt entre una muestra y otra, con un nivel del 5% de significación. Para comprobar cuales son aquellas medias cuyas diferencias son significativas se realiza la prueba de múltiples rangos.

Tabla 20. Comparación de grupos homogéneos.

Sales	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Na ₃ PO ₄	3	-21377.8	X
NaHCO ₃	3	-5401.11	X
Na ₂ CO ₃	3	-3855.56	X
Na ₂ HPO ₄	3	-3133.33	X
NaCl	3	-1736.67	X
NaH ₂ PO ₄	11	34.8727	X

Tabla 21. Homogeneidad entre muestras.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Na ₂ CO ₃ - Na ₂ HPO ₄		-722.223	1296.43
Na ₂ CO ₃ - Na ₃ PO ₄	*	17522.2	1296.43
Na ₂ CO ₃ - NaCl	*	-2118.89	1296.43
Na ₂ CO ₃ - NaH ₂ PO ₄	*	-3890.43	1034.2
Na ₂ CO ₃ - NaHCO ₃	*	1545.56	1296.43
Na ₂ HPO ₄ - Na ₃ PO ₄	*	18244.4	1296.43
Na ₂ HPO ₄ - NaCl	*	-1396.67	1296.43
Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	-3168.21	1034.2
Na ₂ HPO ₄ - NaHCO ₃	*	2267.78	1296.43
Na ₃ PO ₄ - NaCl	*	-19641.1	1296.43
Na ₃ PO ₄ - NaH ₂ PO ₄	*	-21412.7	1034.2
Na ₃ PO ₄ - NaHCO ₃	*	-15976.7	1296.43
NaCl - NaH ₂ PO ₄	*	-1771.54	1034.2
NaCl - NaHCO ₃	*	3664.45	1296.43
NaH ₂ PO ₄ - NaHCO ₃	*	5435.99	1034.2

* indica una diferencia significativa

A continuación, se representa el gráfico de medias en el cual también se aprecian estas diferencias.

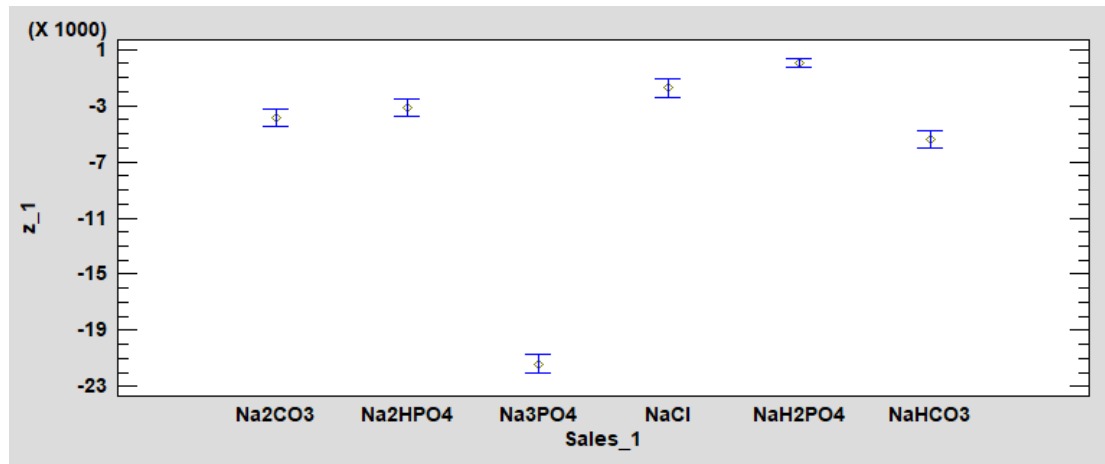


Figura 34. Gráfico de medias.

Por tanto, se observa que las muestras con un potencial z sin diferencias significativas son: las muestras con sales NaHCO₃ y Na₂CO₃, por otro lado, Na₂CO₃ y Na₂HPO₄ y por último NaH₂PO₄ y NaCl.

El potencial de membrana de las células oscila entre -60 y -70 mV, por lo que las muestras al tener potencial z negativo se repelerían con las células, por lo que necesitan un transporte activo para introducirse en la célula. El transporte activo implica el movimiento de moléculas a través de la membrana celular, en contra del gradiente de concentración, desde una región de menor concentración a una región de mayor concentración y requiere energía celular para lograr este movimiento.

7. CONCLUSIONES

Respecto a la Tt del polímero disuelto en distintas sales, se comprueba que la Tt obtenida varía dependiendo de la sal en la que esté disuelto el polímero, además se aprecia que la Tt es muy similar para las muestras que contienen las sales Na_3PO_4 y NaH_2PO_4 (en concentraciones de 5mg/ml) y para las que contienen Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y NaH_2PO_4 (en concentraciones de 50mg/ml).

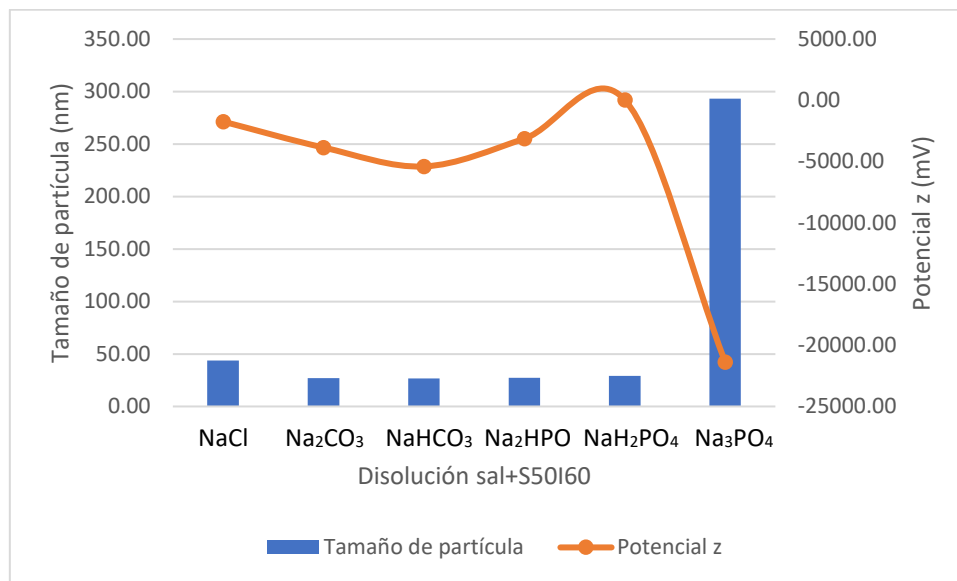


Figura 35. Comparación de los resultados obtenidos en DLS y ELS.

Por otro lado, como se observa en la figura 35, respecto a los valores obtenidos para el tamaño de partícula se observa que todos los tamaños son bastantes similares excepto el tamaño de partícula para la muestra $\text{S}_{50\text{I}60}+\text{Na}_3\text{PO}_4$ cuyo tamaño de partícula es mucho más grande que el del resto de muestras. Esto puede deberse a que el anión de dicha sal presenta 3 cargas negativas. Por lo que, como se observa en la figura 35, las sales que presentan 1 ó 2 cargas negativas tienen tamaños y potenciales z similares, mientras que a partir de 3 cargas negativas se nota un claro aumento del tamaño y por tanto del potencial. Por lo que en el caso de la sal Na_3PO_4 , cada OH de la serina se une a dicho anión con 3 cargas negativas lo que permite estabilizar nanopartículas más grandes, obteniendo a la vez un potencial z mucho mayor.

En la figura 35 también se puede apreciar como la muestra con la sal de NaCl, que es la que menos disminuye la Tt, es la de mayor tamaño respecto a las sales que presentan 1 ó 2 cargas negativas.

Respecto al potencial z , en el anexo 10.5.2 se observa que los valores obtenidos para el polímero S_{50l60} sin impurezas salinas son valores pequeños respecto a los obtenidos en presencia de impurezas ya que los aniones rodean a las nanopartículas que se forman provocando que sus cargas aumenten. Se obtuvieron medidas distintas entre sí, pero destacaron: la muestra $S_{50l60}+Na_3PO_4$ cuyo potencial z es muy grande como consecuencia del tamaño de partícula grande que se comentó anteriormente, ya que, al tener mayor tamaño, mayor cantidad de aniones rodearán a las nanopartículas; también destaca la muestra $S_{50l60}+NaH_2PO_4$ cuyos valores de potencial z oscilan entre valores positivos y negativos siendo el resultado final un potencial bastante pequeño en comparación con el resto de las muestras y más próximo a 0, lo que significa que las partículas formadas en este caso tienen menor carga superficial negativa.

En conclusión, la utilización del polímero S_{50l60} disuelto en distintas sales presentes en el cuerpo humano para la dosificación de fármacos, sería posible, pero hay que tener en cuenta los distintos aspectos de cada muestra ya que son en general muy distintas entre sí, exceptuando las muestras disueltas en Na_2CO_3 y Na_2HPO_4 que solo difieren en la Tt obtenida mediante turbidimetría.

En general, todas las muestras forman nanopartículas cuyo interior es hidrofóbico, por lo que los fármacos que se pretenden encapsular deben ser hidrofóbicos para unirse hidrofóbicamente a dichas partículas.

En el caso de que el fármaco prefiera nanopartículas grandes, la mejor opción sería el polímero disuelto en Na_3PO_4 , mientras que si prefiere partículas pequeñas el resto de las sales serían útiles.

Si el fármaco fuese hidrofílico y de carga positiva, este se uniría a la superficie externa de las nanopartículas por lo que no sería factible. Si fuese hidrofílico y de carga negativa se repelería con las nanopartículas debido a que presentan un potencial z negativo.

Respecto al potencial de membrana, al ser negativo al igual que los potenciales z de las muestras, significa que para introducirse en las células será necesario que se produzca un transporte activo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Macarulla, J.M.; Goñi, F.M. (1987). "Biomoléculas. Lecciones de Bioquímica Estructural". Reverté.
- [2] Ibáñez-Fonseca, A., Flora, T., Acosta, S., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2019). Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials. *Matrix Biology*, 84, 111-126. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.003>
- [3] Kim, W., & Chaikof, E. L. (2010). Recombinant elastin-mimetic biomaterials: Emerging applications in medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.007>
- [4] Santos, M., Serrano-Dúcar, S., Gonzalez-Valdivieso, J., Vallejo, R., Girotti, A., Cuadrado, P., & Arias, F. J. (2020). Genetically Engineered Elastin-based Biomaterials for Biomedical Applications. *Current Medicinal Chemistry*, 26(40), 7117-7146.
<https://doi.org/10.2174/0929867325666180508094637>
- [5] Tan, L. H., Pu, Y., Pattathil, S., Avci, U., Qian, J., Arter, A., Chen, L., Hahn, S. K., Ragauskas, A. J., & Kieliszewski, M. J. (2014). Changes in Cell Wall Properties Coincide with Overexpression of Extensin Fusion Proteins in Suspension Cultured Tobacco Cells. *PLOS ONE*, 9(12), e115906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115906>
- [6] Edmonds, R. L., & Cooper, S. (2012). La importancia de la distribución de la elastina y morfología en la piel La importancia de la distribución de la elastina y morfología en la piel ovina / The importance of elastin distribution and morphology in ovine leather. *Journal of aqeic*, 63(3), 41-51.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7066193>
- [7] Fernández-Colino, A., Girotti, A., Lopez, M. A., Arias, F. J., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2011). Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. *Biomecánica*, 19(1), 8-16. <https://doi.org/10.5821/sibb.v19i1.1811>
- [8] Machado, R., Bessa, P. C., Reis, R. L., Rodríguez-Cabello, J. C., & Casal, M. (2012). Elastin-Based Nanoparticles for Delivery of Bone Morphogenetic Proteins. En *Methods in molecular biology* (pp. 353-363). Springer Science+Business Media.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_29

- [9] Rodríguez-Cabello, J. C., De Torre, I. G., Acosta, S., Salinas, S., & Herrero, M. (2018). Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling. Elsevier eBooks, 49-78. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102015-9.00004-6>
- [10] Rodríguez-Cabello, J. C., Fonseca, A. I., Alonso, M., Poczka, L., Cipriani, F., & De Torre, I. G. (2017). Elastin-Like Polymers: Properties, Synthesis, and Applications. Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 1-36. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst656>
- [11] Gray, W. A., Sandberg, L. B., & Foster, J. A. (1973). Molecular Model for Elastin Structure and Function (Vol. 246). Nature Portfolio. <https://doi.org/10.1038/246461a0>
- [12] Skoog, D. A. (2008). Principios de análisis instrumental. 6e.
- [13] Haven, M. C., Tetrault, G. A., & Schenken, J. R. (1994). Laboratory Instrumentation. John Wiley & Sons.
- [14] Zetasizer ZSP. (s. f.). (6 de junio de 2020): <https://iesmat.com/productos/00000006893/malvern-panalytical-ltd-zetasizer-zsp/>
- [15] Malvern Panalytical. (s. f.). Dispersión de luz electroforética ELS | Medición de movilidad electroforética (6 de junio de 2020). <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/electrophoretic-light-scattering>
- [16] Malvern Panalytical. (s. f.-a). Dispersión de luz dinámica DLS (6 de junio de 2020). <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- [17] J. L. Mier, R. Artiaga, L. García, “Síntesis de Polímeros. Pesos moleculares. Conformación y configuración”, Universidad de Coruña. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9638/CC_32_art_1.pdf
- [18] Comprendiendo y desafiando los límites de la técnica DLS – Guíalab. (s. f.) (6 de junio de 2020). <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/comprendiendo-y-desafiando-los-limites-de-la-tecnica-dls/>
- [19] Biagio, P. L. S., Madonia, F., Trapane, T. L., & Urry, D. W. (1988). The overlap of elastomeric polypeptide coils in solution required for single-phase initiation of elastogenesis. Chemical Physics Letters, 145(6), 571-574. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(88\)87422-0](https://doi.org/10.1016/0009-2614(88)87422-0)

- [20] Antony, A., & Mitra, J. (2021). Refractive index-assisted UV/Vis spectrophotometry to overcome spectral interference by impurities. *Analytica Chimica Acta*, 1149, 238186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.061>
- [21] Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- [22] Giraldo, J. E. T. (2007). Mediciones de potencial zeta de microesferas de vidrio en glicol de etileno y en soluciones tampón de fosfato. *Dialnet*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4803885>

9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

- Tabla 1. Clasificación de aminoácidos
- Tabla 2. Datos disoluciones salinas
- Tabla 3. Resultados obtenidos en turbidimetría
- Tabla 4. Tabla ANOVA de los resultados de turbidimetría
- Tabla 5. Comparación de grupos homogéneos de los resultados de turbidimetría
- Tabla 6. Homogeneidad entre muestras de los resultados de turbidimetría
- Tabla 7. Resultados obtenidos en DSC.
- Tabla 8. Tabla ANOVA de los resultados obtenidos en DSC
- Tabla 9. Comparación de grupos homogéneos de los resultados obtenidos en DSC
- Tabla 10. Homogeneidad entre muestras de los resultados obtenidos en DSC
- Tabla 11. Comparación de tamaño de partículas en el tiempo
- Tabla 12. Evolución del tamaño de partícula de la muestra $S_{50}I_{60} + Na_3PO_4$
- Tabla 13. Resultados obtenidos en para el tamaño de partícula
- Tabla 14. Índice de polidispersidad de cada muestra.
- Tabla 15. Tabla ANOVA de los resultados obtenidos en DLS
- Tabla 16. Comparación de grupos homogéneos de los resultados obtenidos en DLS
- Tabla 17. Homogeneidad entre muestras de los resultados obtenidos en DLS
- Tabla 18. Resultados obtenidos en ELS (potencial zeta).
- Tabla 19. Tabla ANOVA de los resultados obtenidos en ELS
- Tabla 20. Comparación de grupos homogéneos de los resultados obtenidos en ELS
- Tabla 21. Homogeneidad entre muestras de los resultados obtenidos en ELS.

FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo de estiramiento y relajación de la elastina.
- Figura 2. Estructura clatrato del agua
- Figura 3. Imagen representativa de una Horquilla β
- Figura 4. Esquema del cambio conformacional de los polímeros ELR.
- Figura 5. Fotografía de crisoles de aluminio para DSC.
- Figura 6. Fotografía de un soporte de crisoles.
- Figura 7. Fotografía del cierracrisoles

- Figura 8. Fotografía de una cubeta de plástico de 1 ml.
- Figura 9. Fotografía del capilar plegado.
- Figura 10. Fotografía de la Mufla
- Figura 11. Fotografía de la microbalanza
- Figura 12. Fotografía del espectrofotómetro
- Figura 13. Fotografía del interior del espectrofotómetro
- Figura 14. Fotografía del DSC
- Figura 15. Fotografía del horno del DSC.
- Figura 16. Fotografía del Zetasizer Nano
- Figura 17. Fotografía de interior del zetasizer Nano
- Figura 18. Esquema turbidimetría y sus componentes
- Figura 19. Soporte de muestra y hornos de un DSC de potencia compensada
- Figura 20. Soporte de muestras y horno de un DSC de flujo de calor.
- Figura 21. Representación de las medidas 1, 2 y 3 de la muestra NaCl + S_{50l60} en turbidimetría
- Figura 22. Representación de la primera derivada de la medida 1 de la muestra NaCl + S_{50l60} en turbidimetría
- Figura 23. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra (Turbidimetría). * indica que presentan diferencias significativas.
- Figura 24. Gráfico de medias de los resultados de turbidimetría
- Figura 25. Gráfico del DSC de las tres medidas realizadas para la muestra S_{50l60} + NaCl
- Figura 26. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra (DSC).
* indica que presentan diferencias significativas.
- Figura 27. Gráfico de medias de los resultados obtenidos en DSC
- Figura 28. Volumen frente al tamaño de partícula de la muestra S_{50l60} + NaCl (medida 1).
- Figura 29. Intensidad frente a tamaño de partícula de la muestra S_{50l60} + NaCl (media 1).
- Figura 30. Coeficiente de correlación del tamaño de partícula frente al tiempo de la muestra S_{50l60} + NaCl (medida 1).
- Figura 31. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra (DLS).
* indica que presentan diferencias significativas.

Figura 32. Gráfico de medias de los resultados obtenidos en DLS

Figura 33. Representación de la media y la desviación estándar de cada muestra (ELS).

* indica que presentan diferencias significativas.

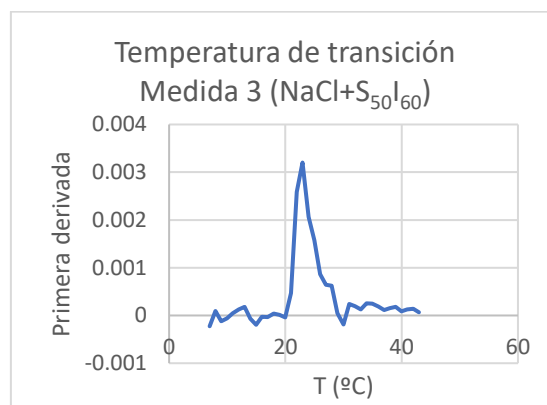
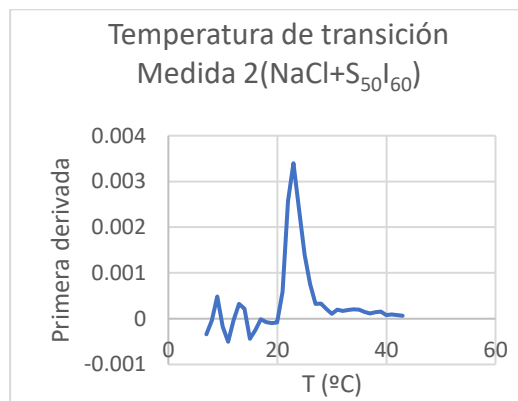
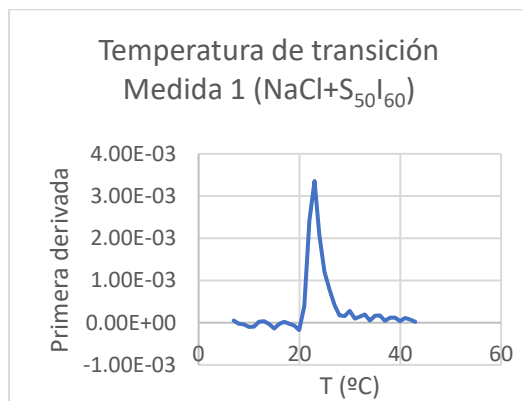
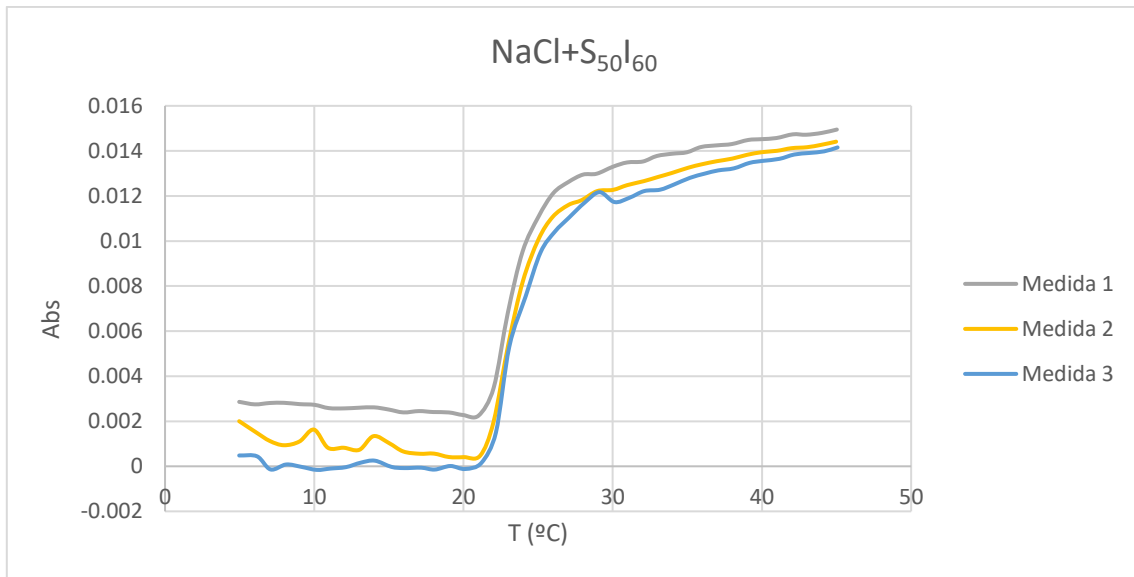
Figura 34. Gráfico de medias de los resultados obtenidos en ELS

Figura 35. Comparación de los resultados obtenidos en DLS y ELS.

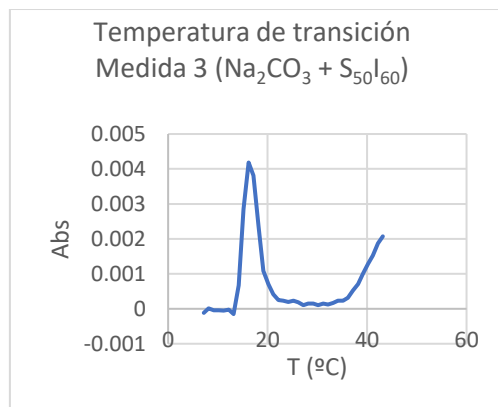
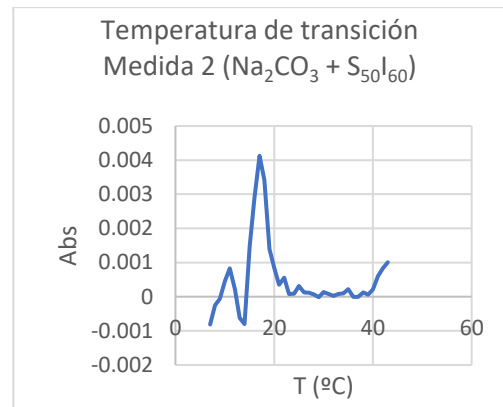
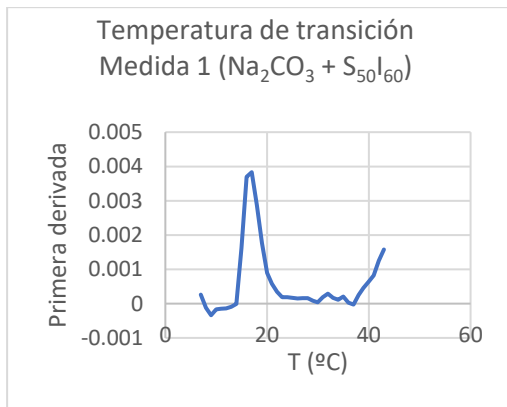
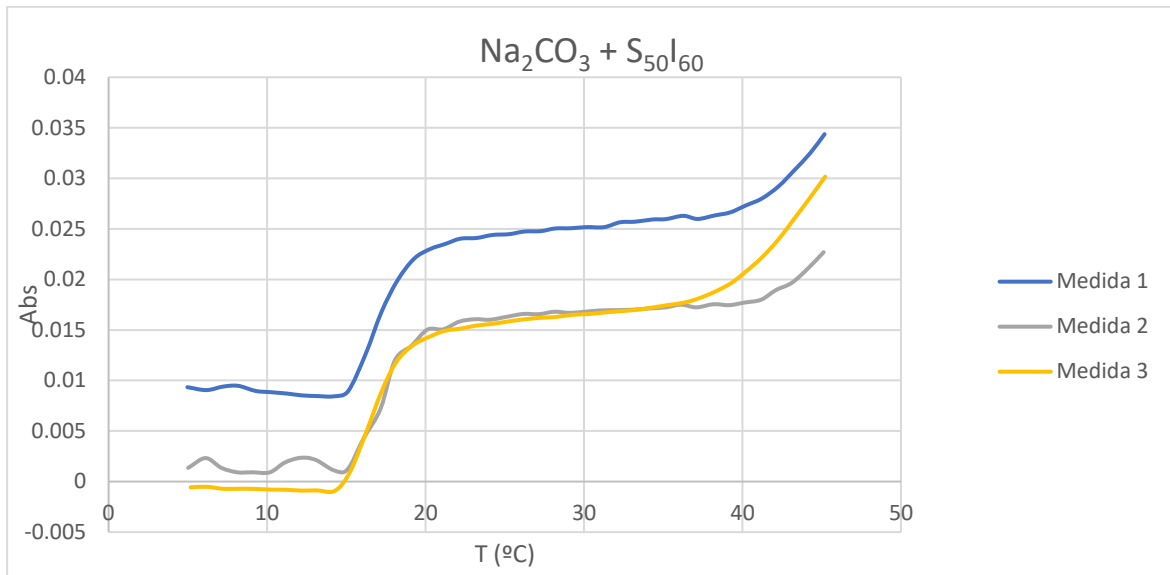
10. ANEXO

10.1. Turbidimetría

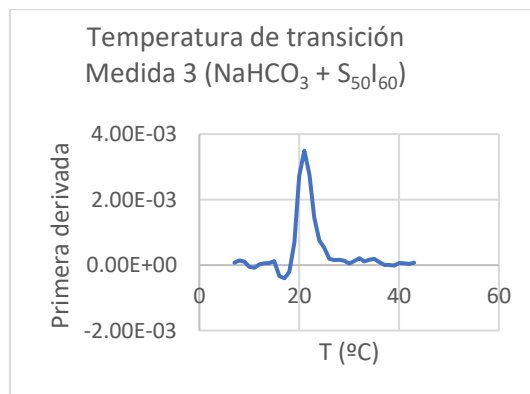
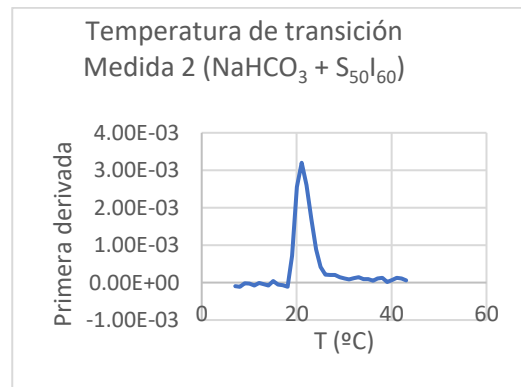
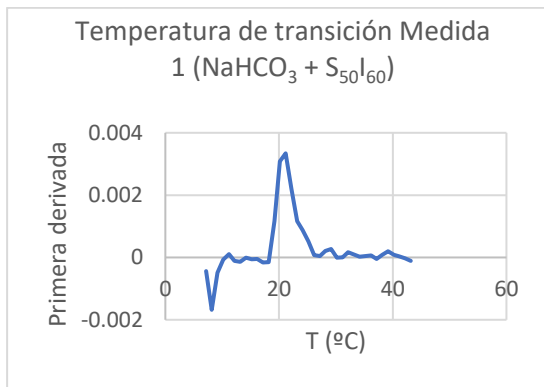
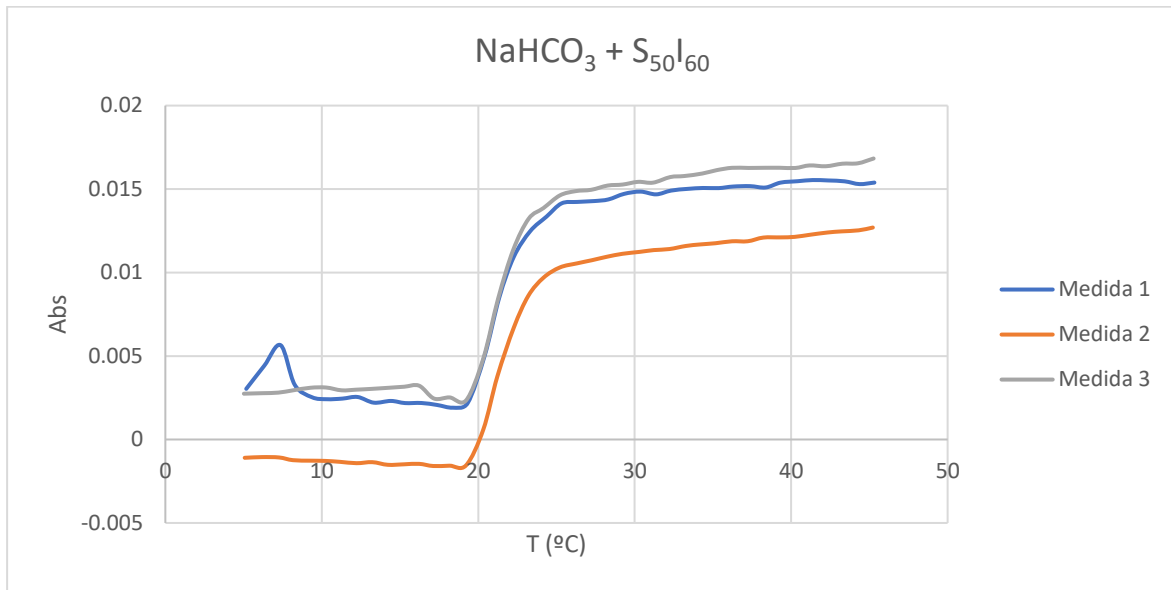
▪ NaCl + S₅₀I₆₀



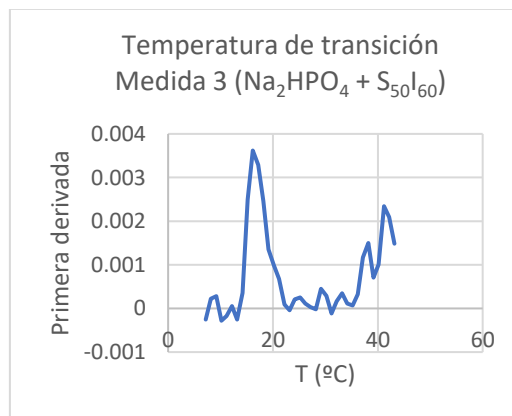
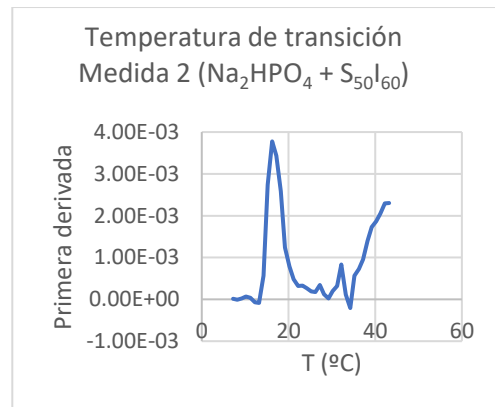
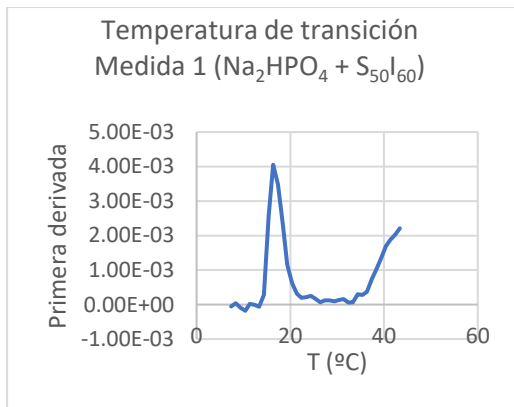
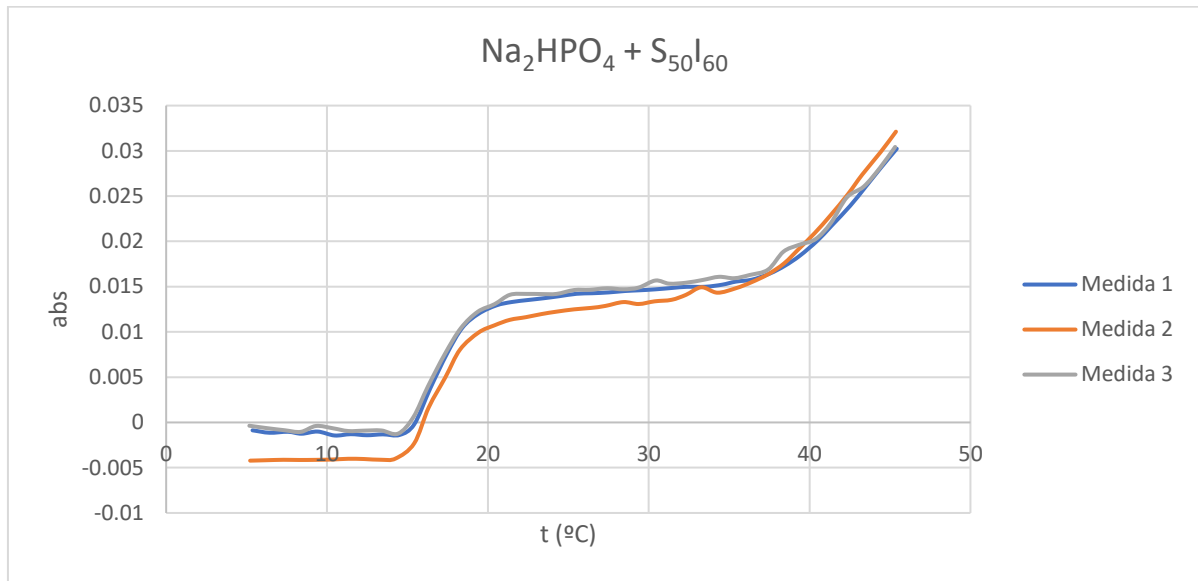
▪ $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{S}_{50}\text{I}_{60}$



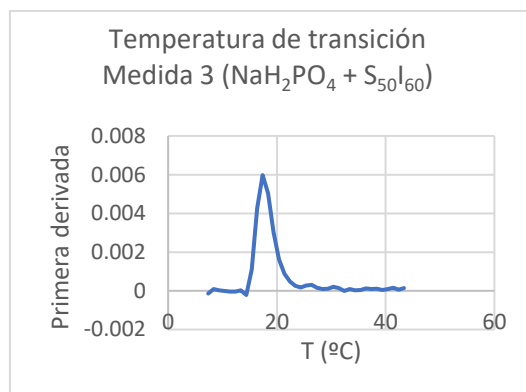
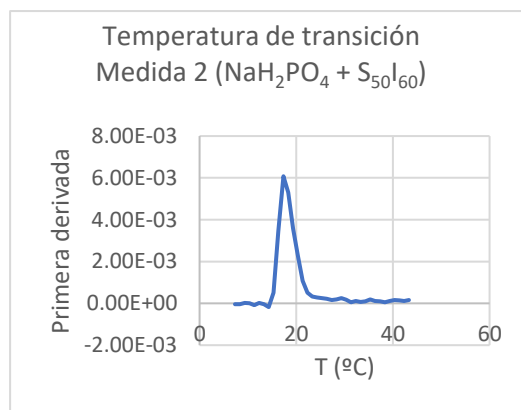
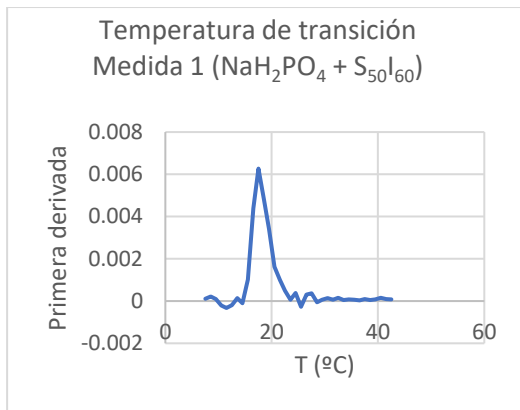
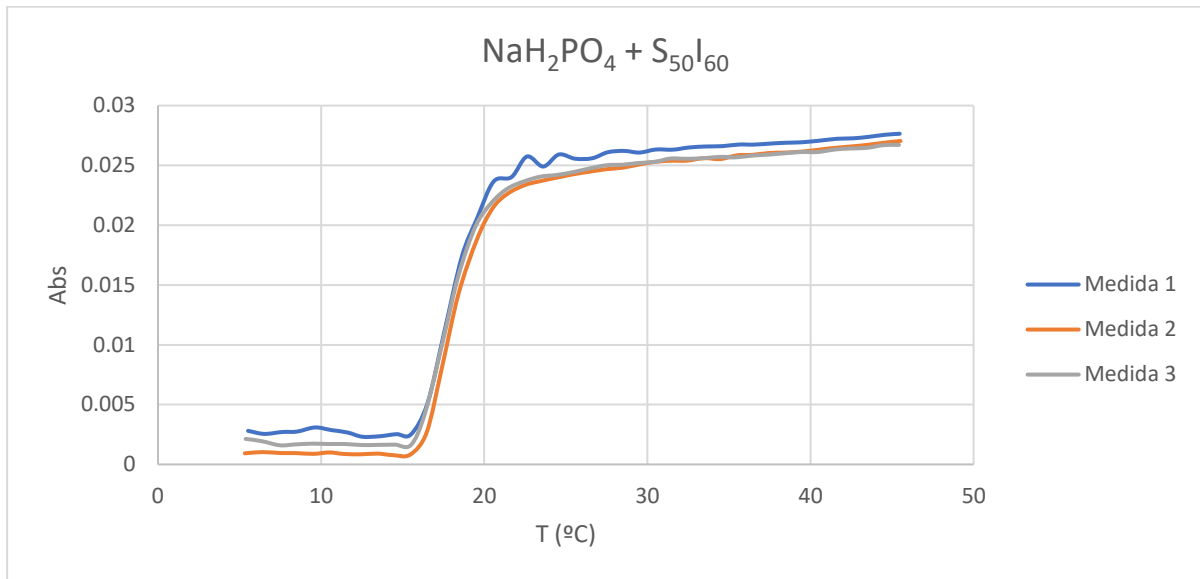
▪ $\text{NaHCO}_3 + \text{S}_{50\text{l}_{60}}$



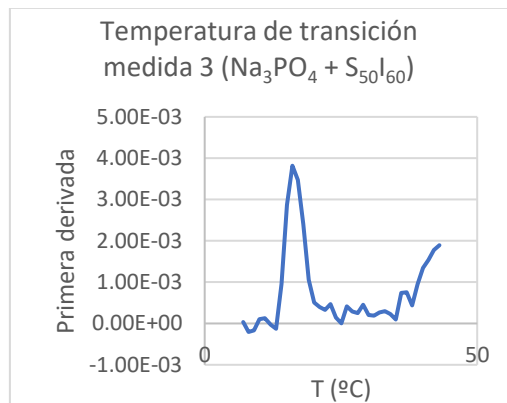
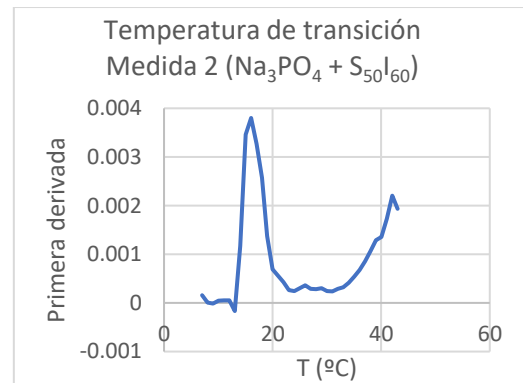
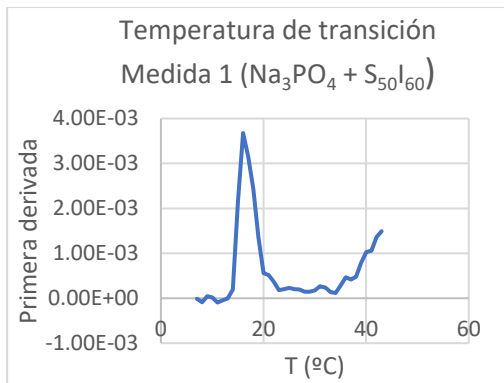
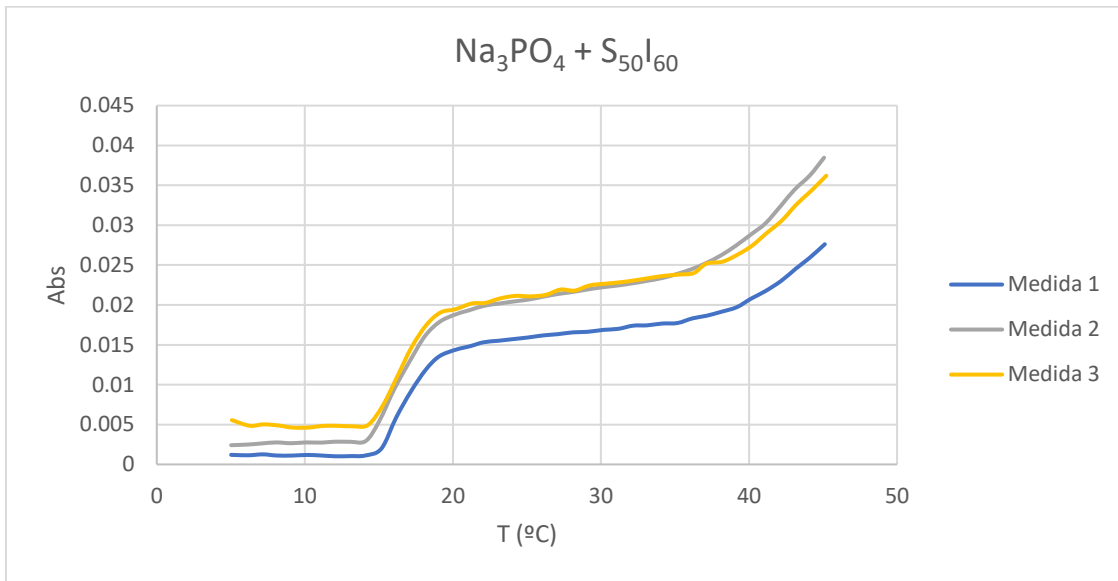
▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{S}_{50}\text{I}_{60}$



▪ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{S}_{50}\text{I}_{60}$

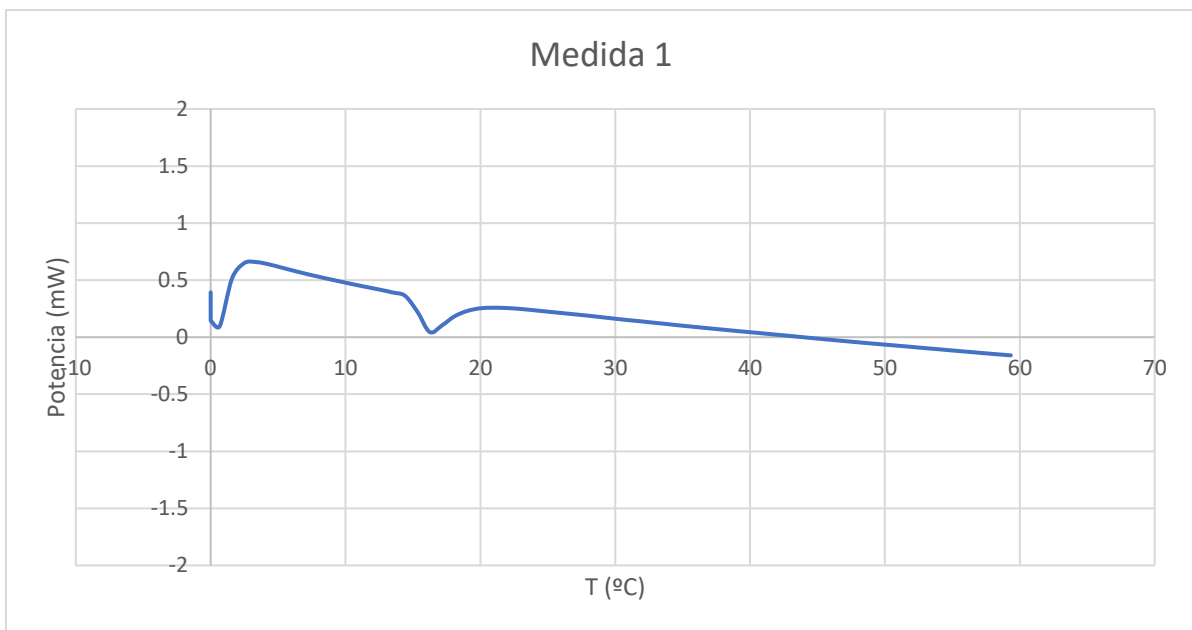
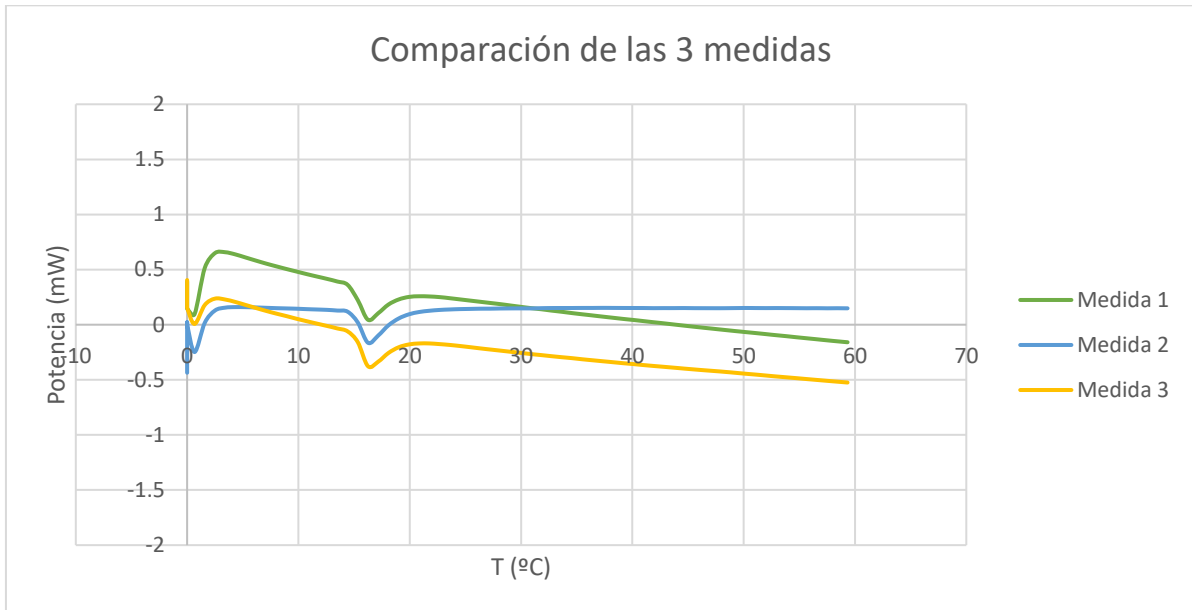


▪ $\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{S}_{50}\text{I}_{60}$

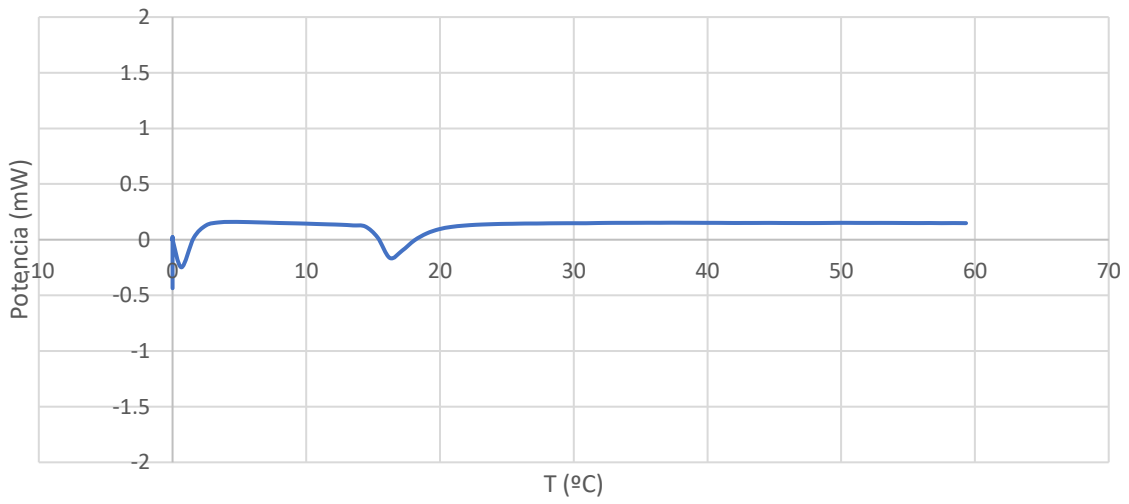


10.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

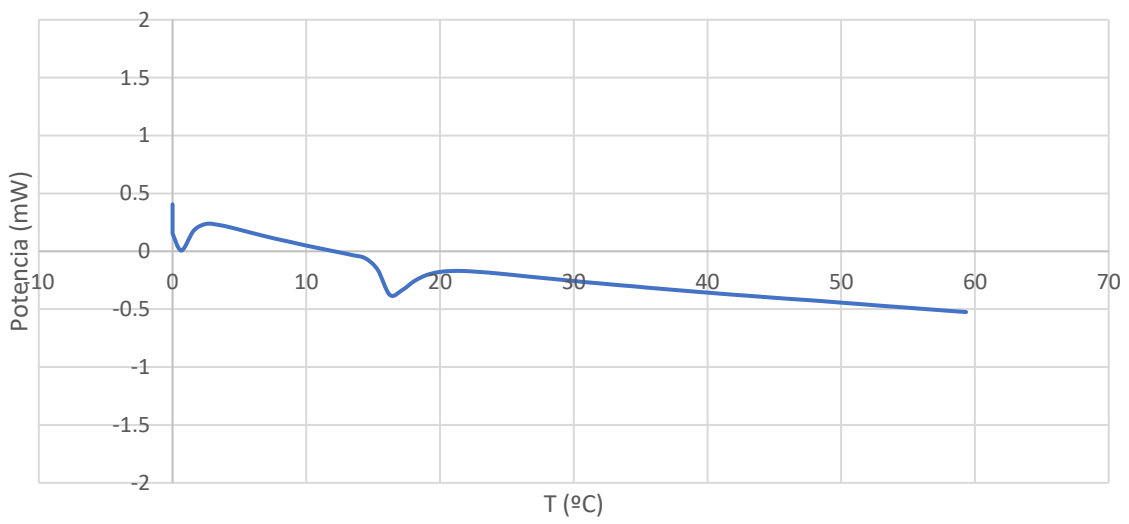
▪ NaCl + S₅₀I₆₀



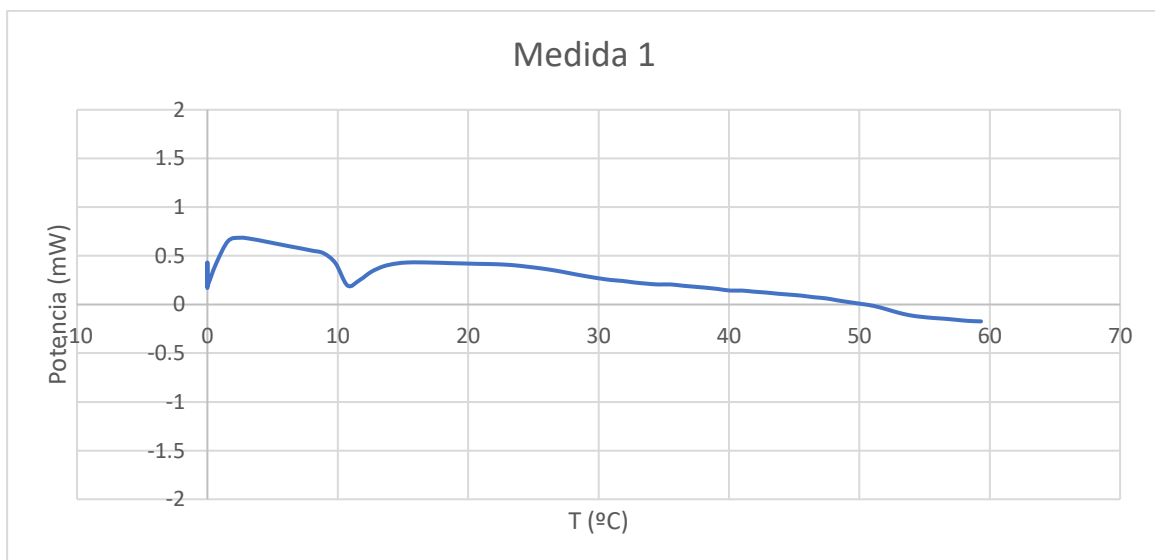
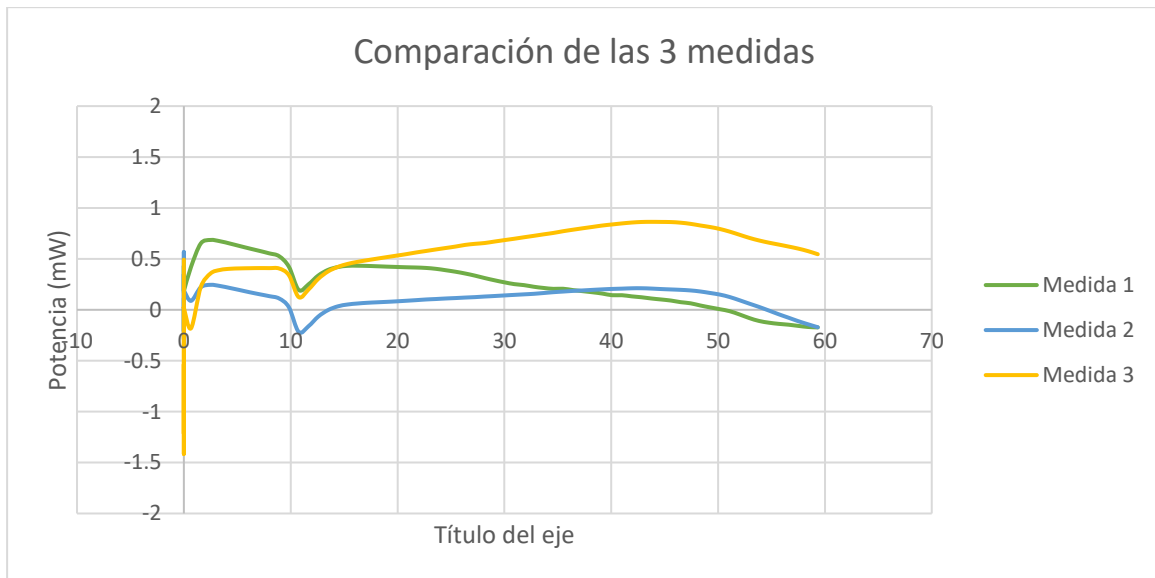
Medida 2



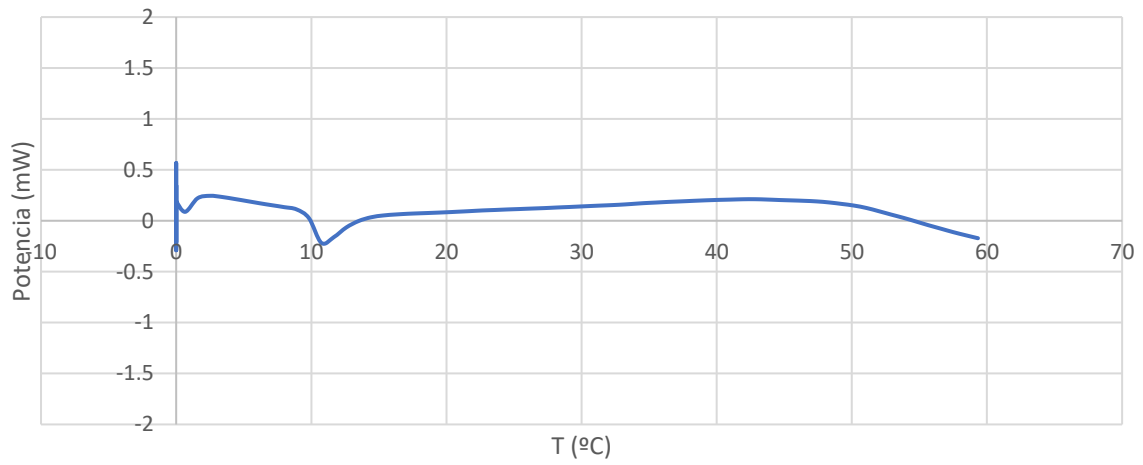
Medida 3



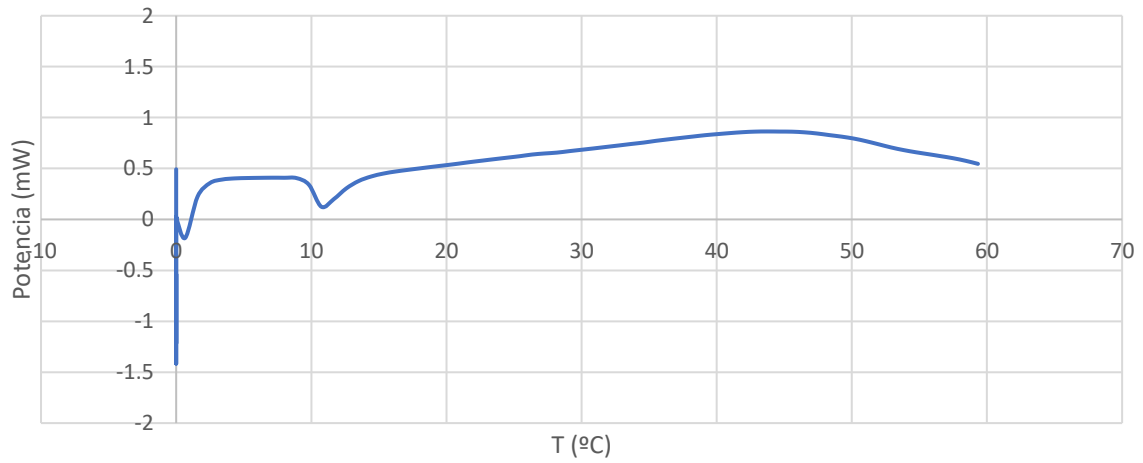
▪ $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{S}_{50}\text{I}_{60}$



Medida 2

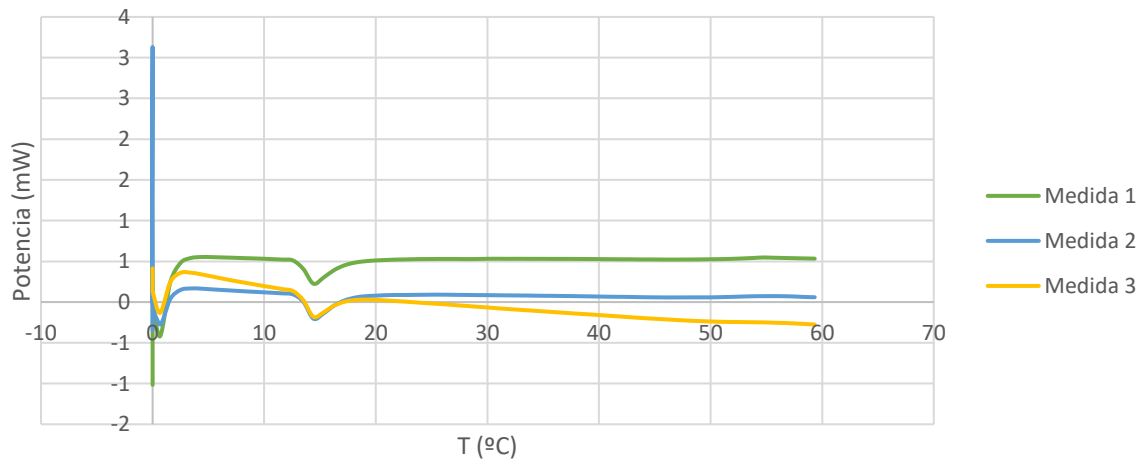


Medida 3

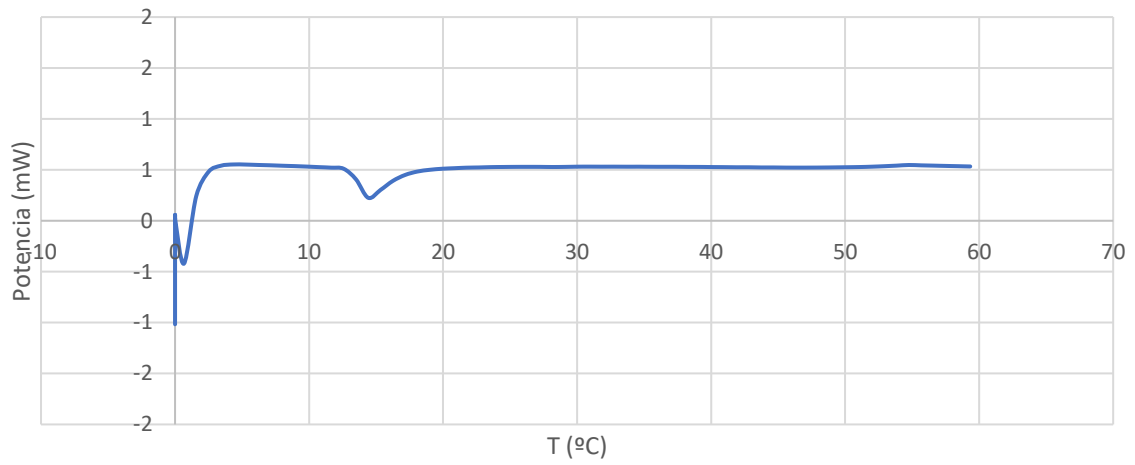


▪ $\text{NaHCO}_3 + \text{S}_{50/60}$

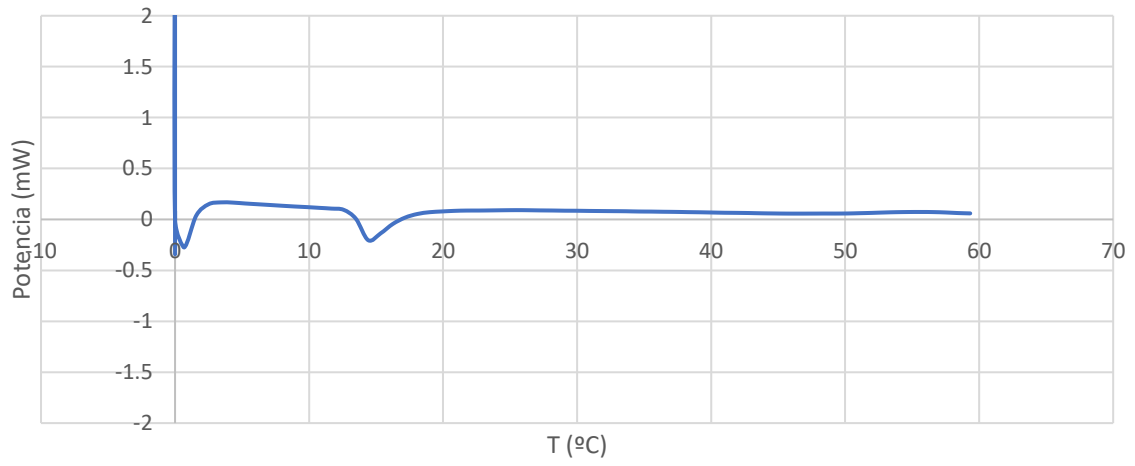
Comparación de las 3 medidas



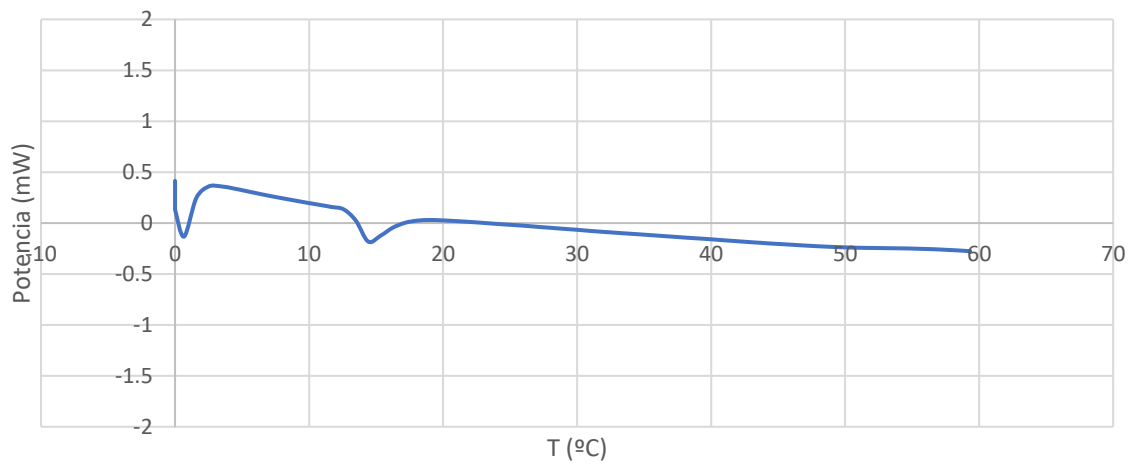
Medida 1



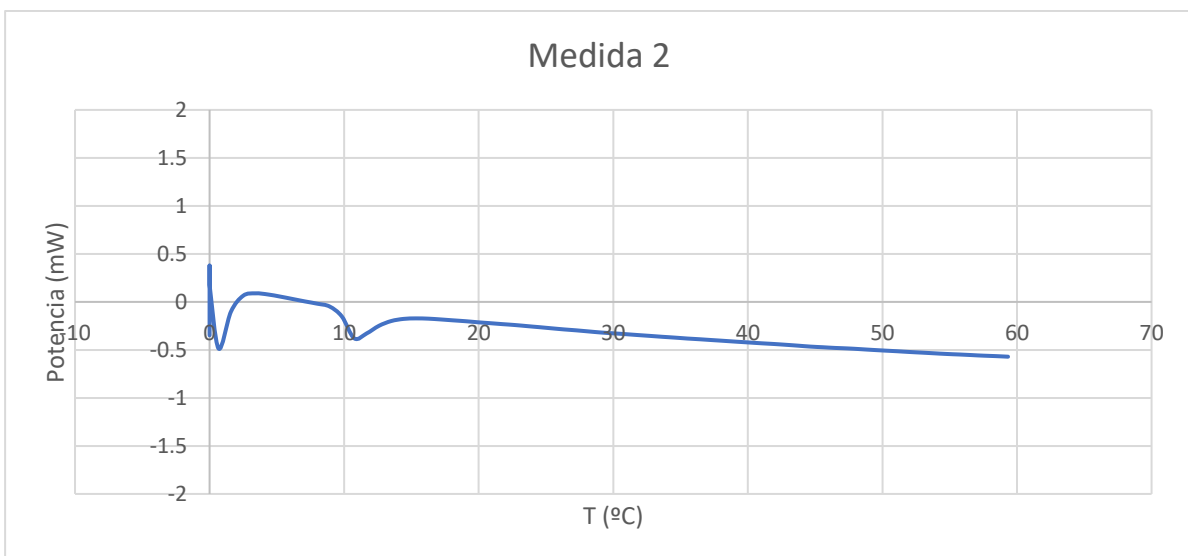
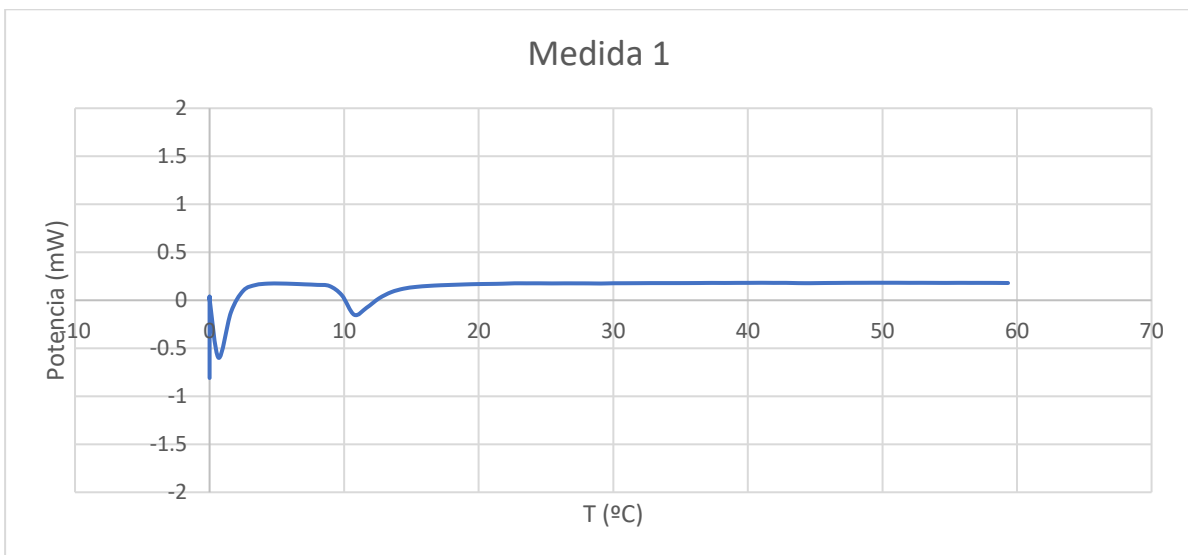
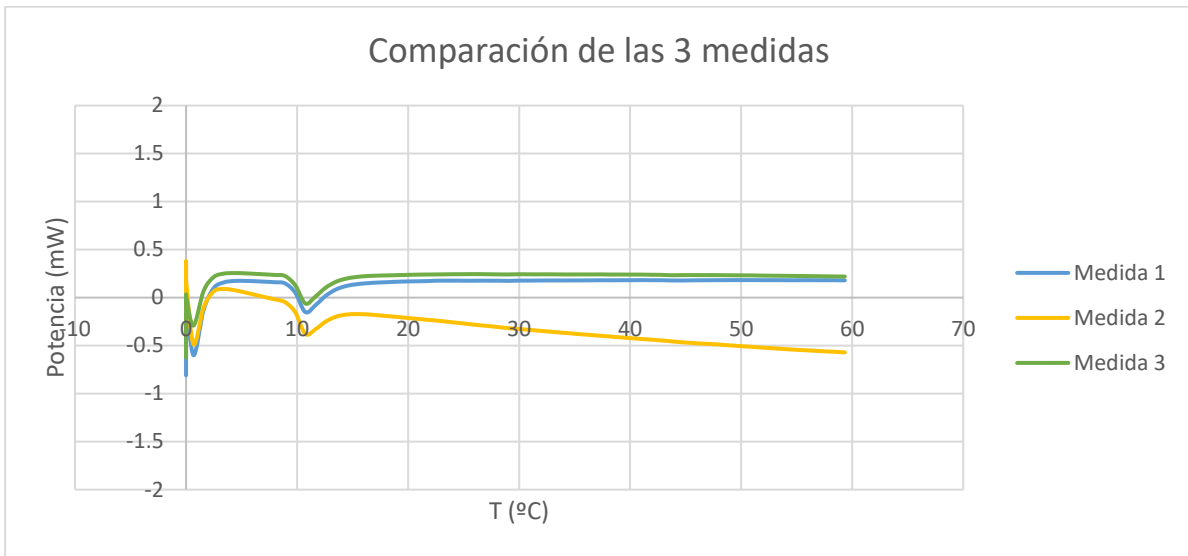
Medida 2



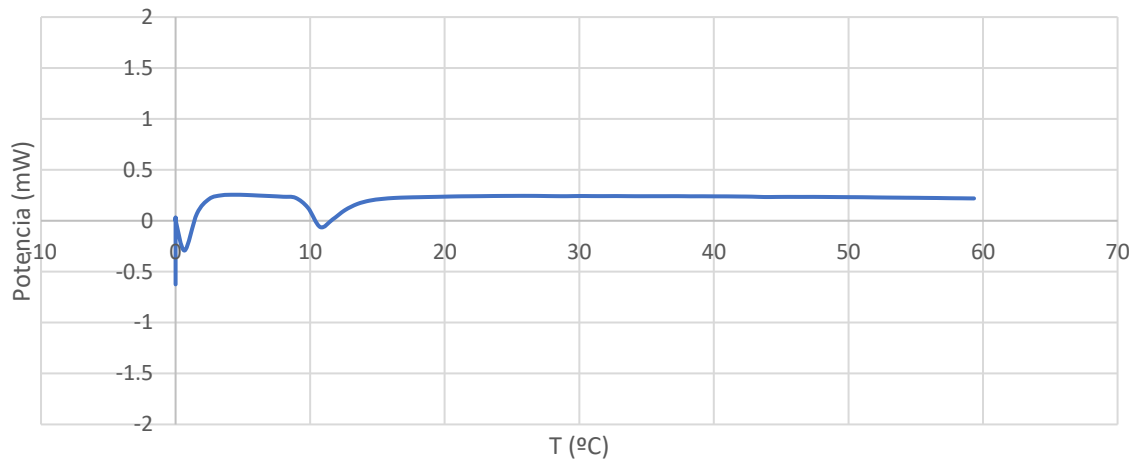
Medida 3



▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{S}_{50/60}$

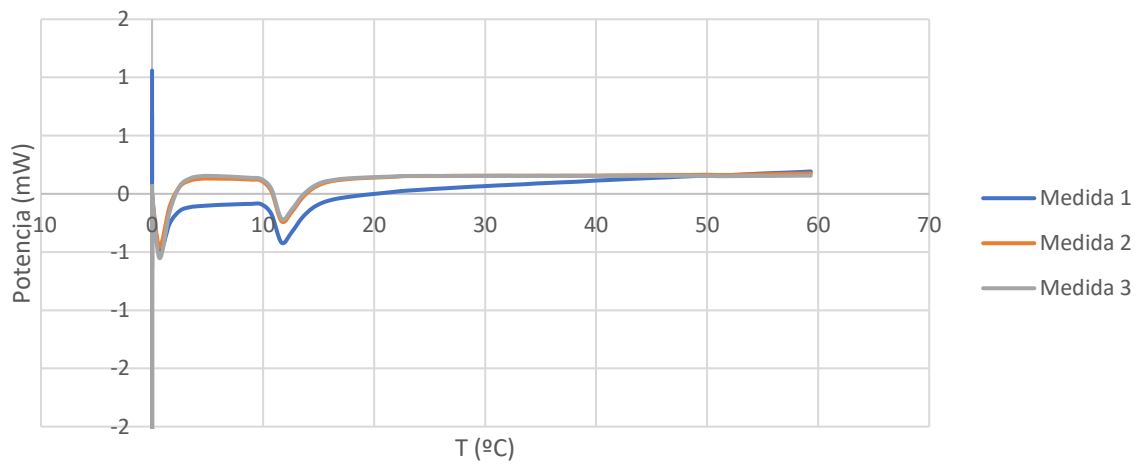


Medida 3

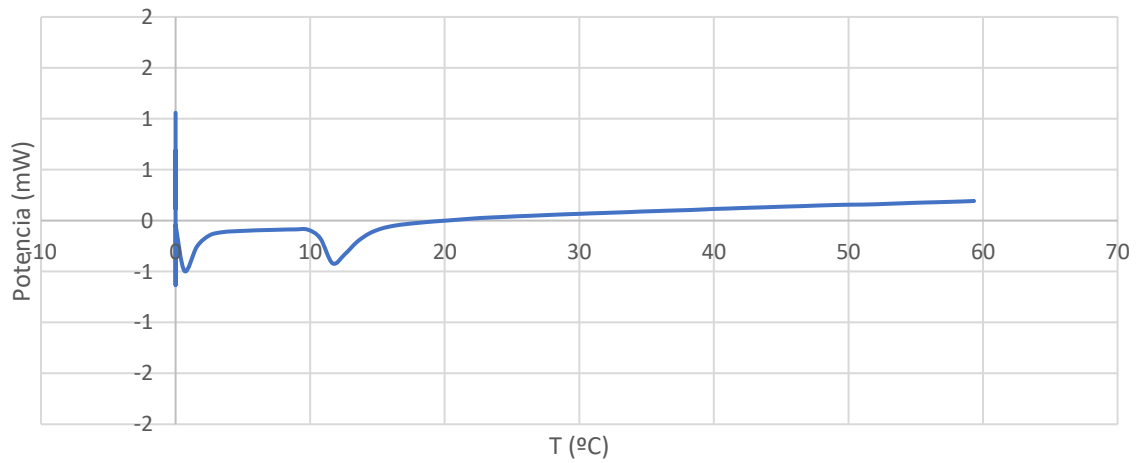


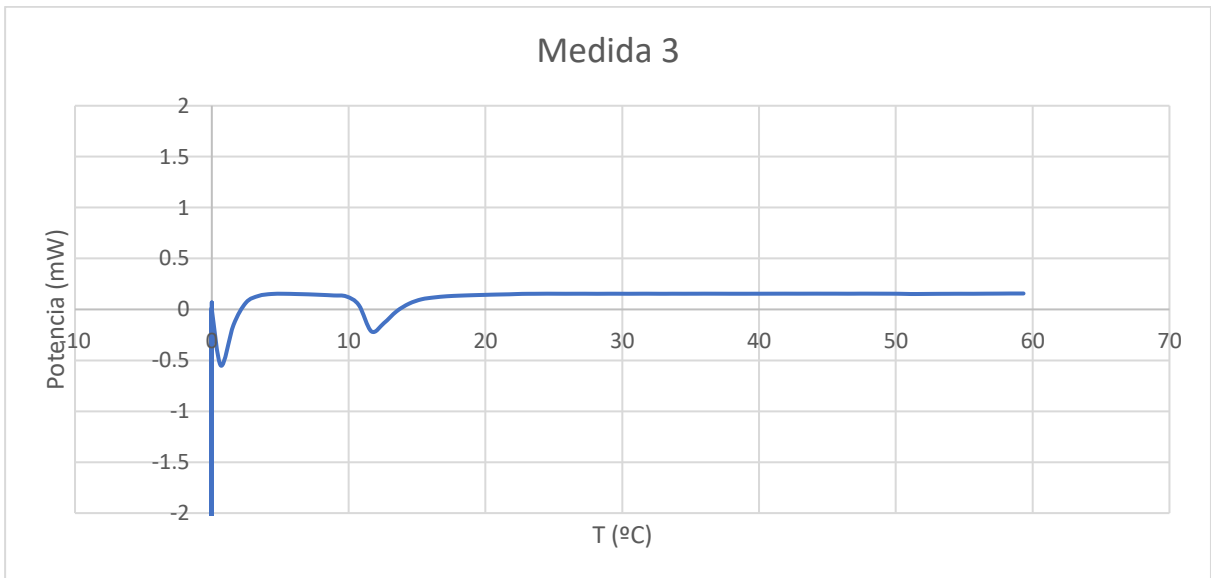
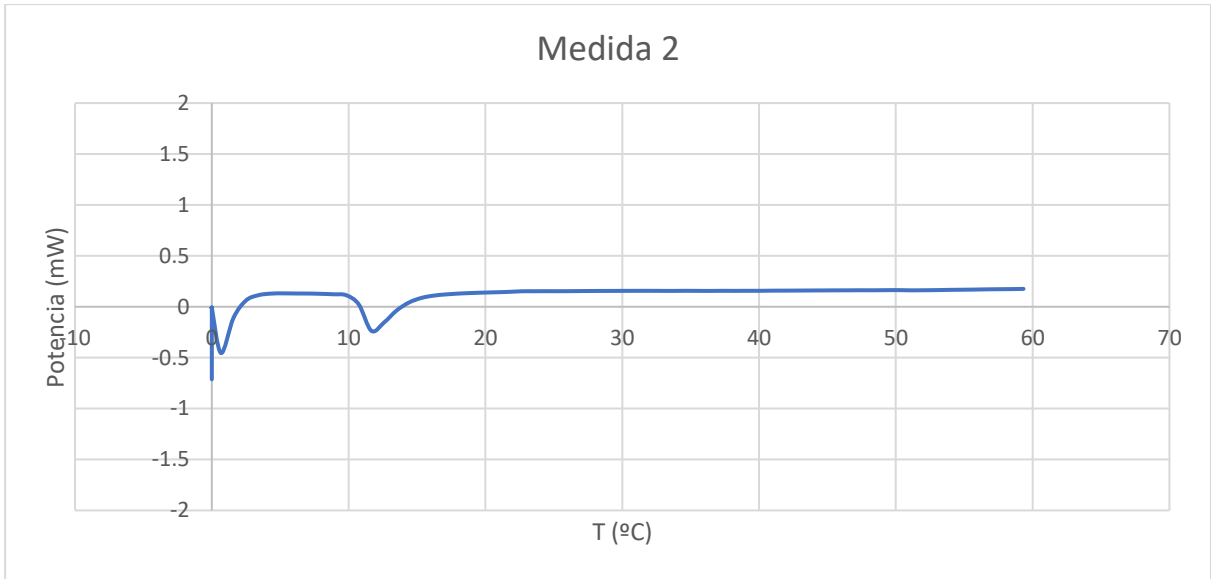
▪ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{S}_{50/60}$

Comparación de las 3 medidas

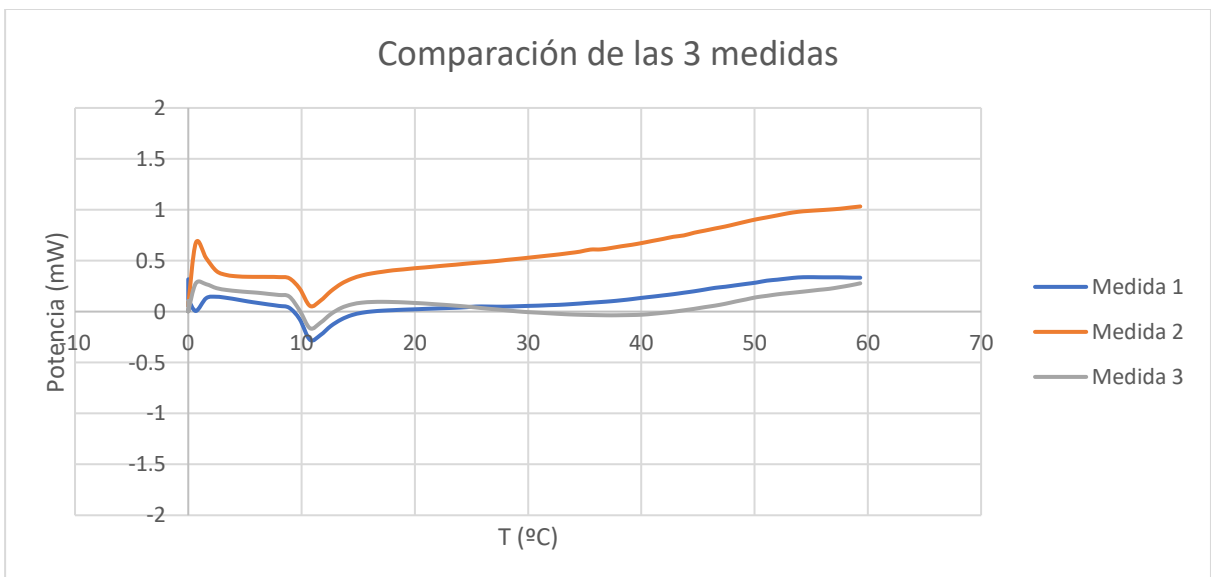


Medida 1

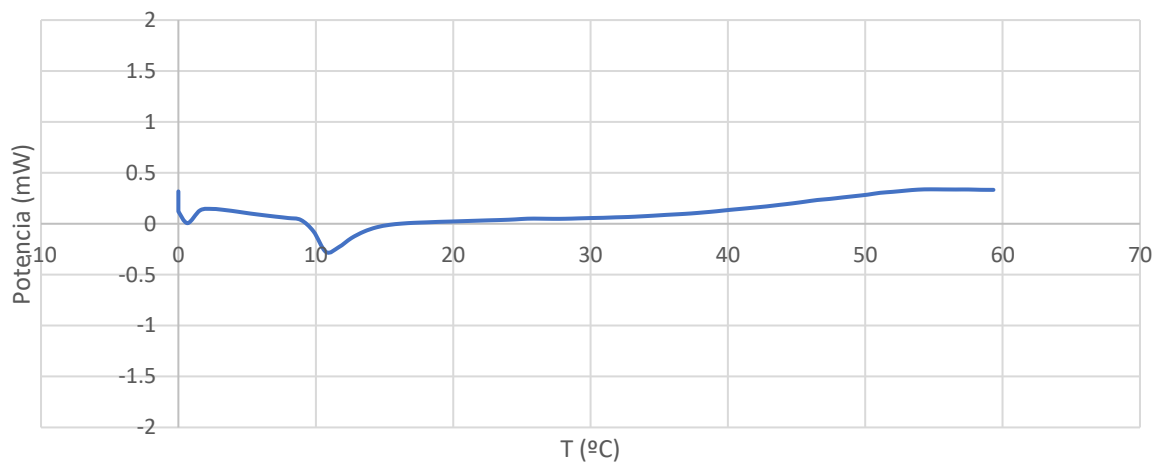




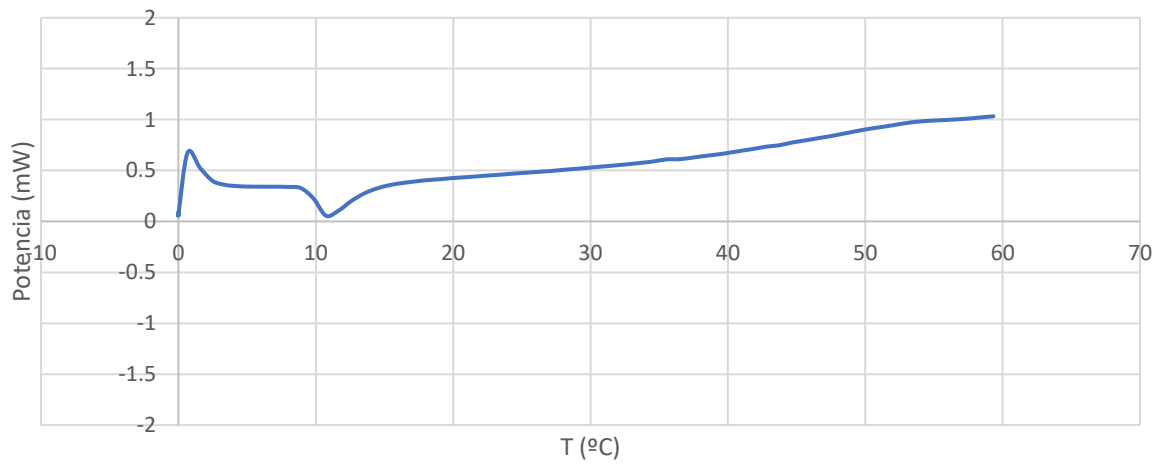
▪ **Na₃PO₄ + S₅₀l₆₀**



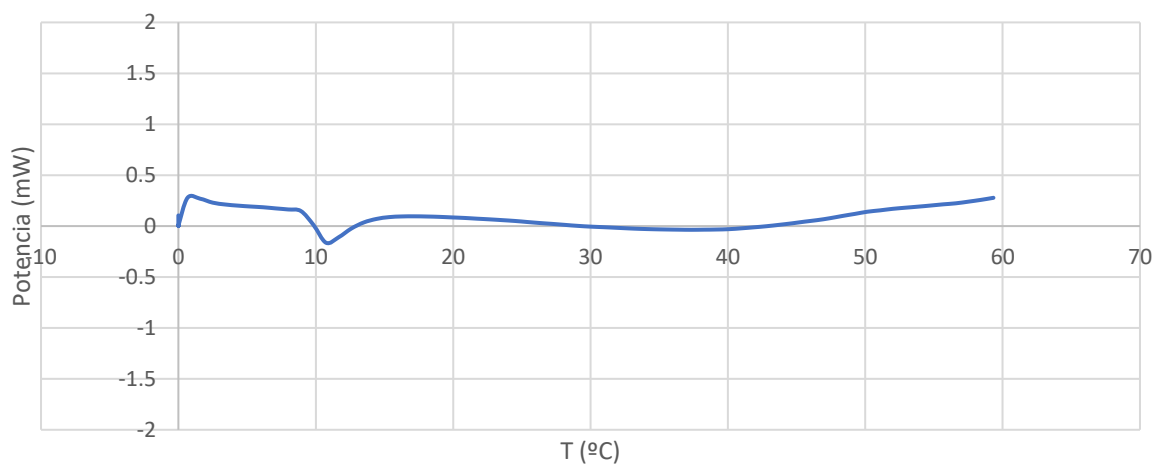
Medida 1



Medida 2

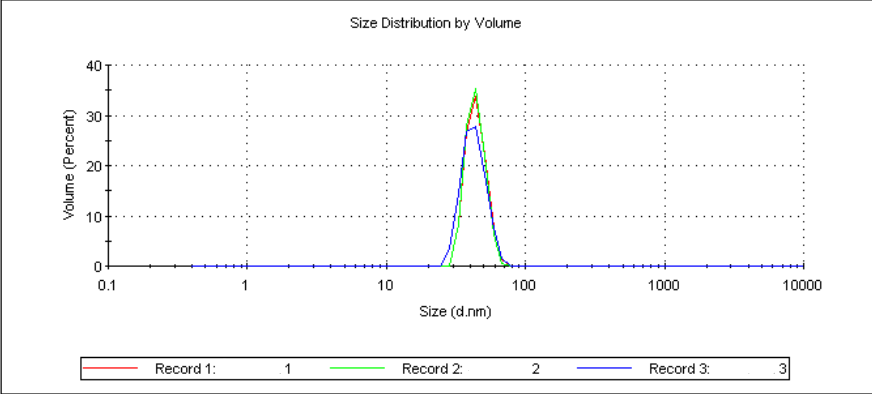


Medida 3

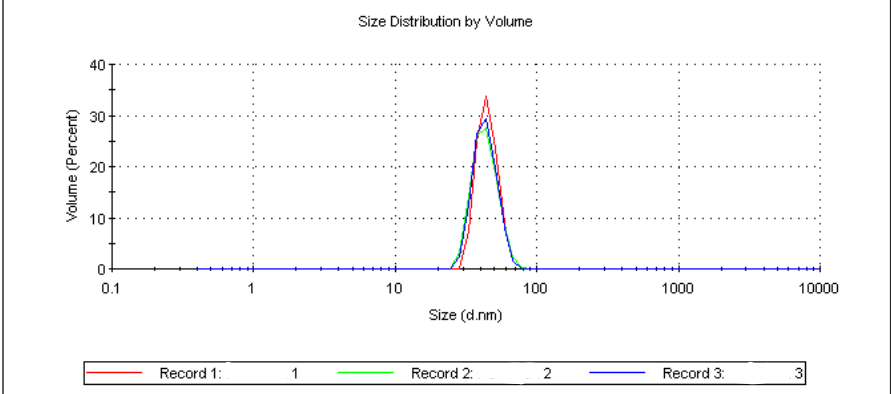


10.3. Zetasizer: DLS

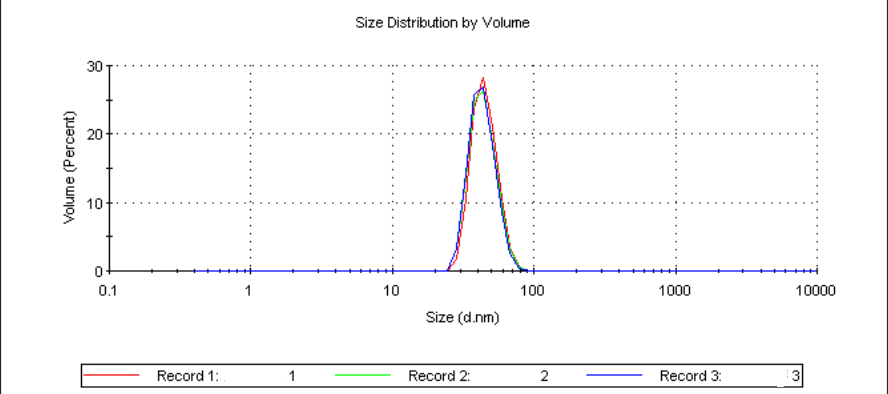
- NaCl + S₅₀₁₆₀
 - Volumen:
 - Medida 1



- Medida 2

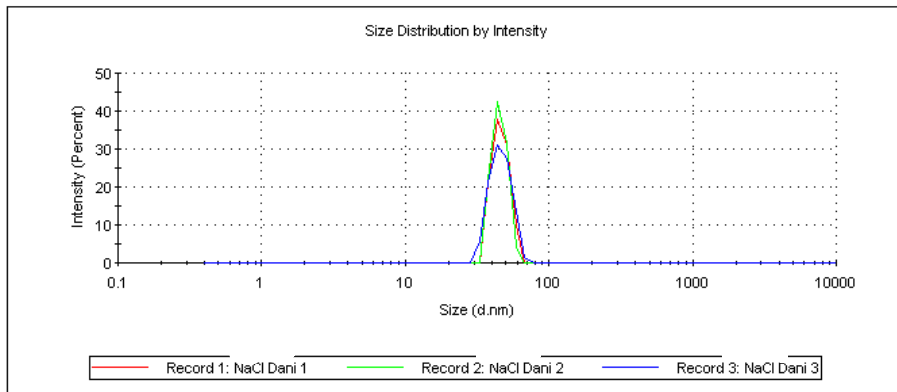


- Medida 3

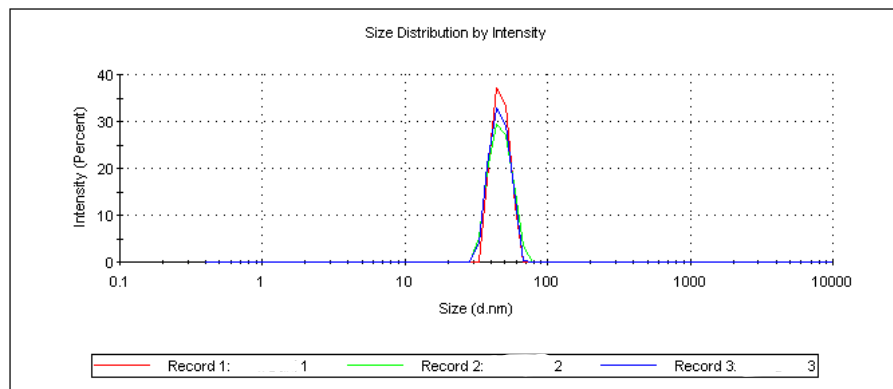


▪ Intensidad:

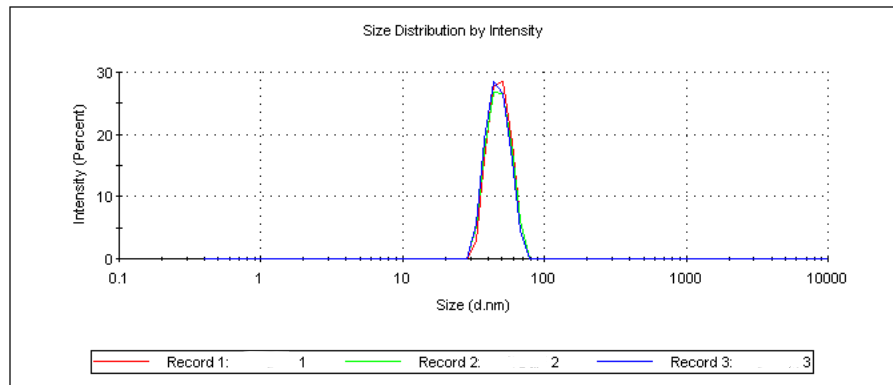
○ Medida 1



○ Medida 2

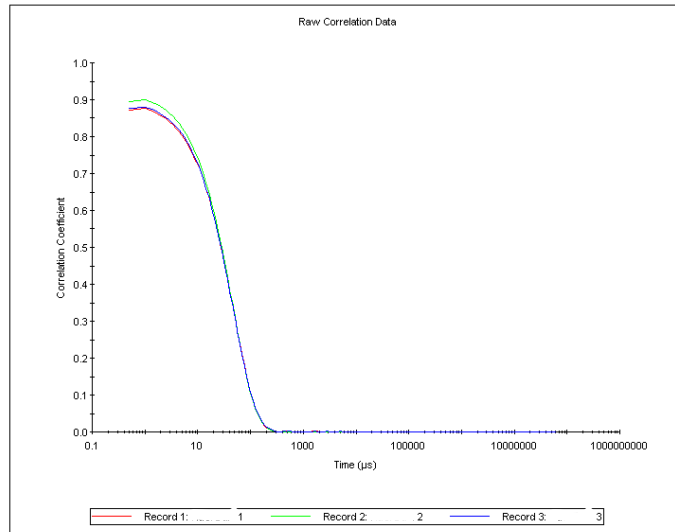


○ Medida 3

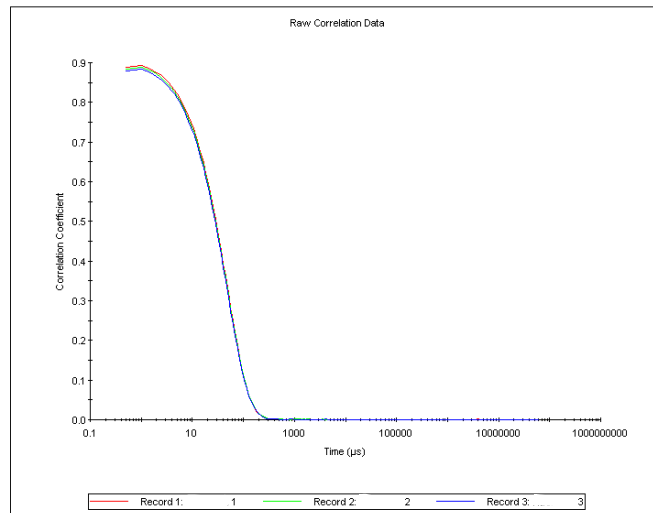


■ Correlogramas:

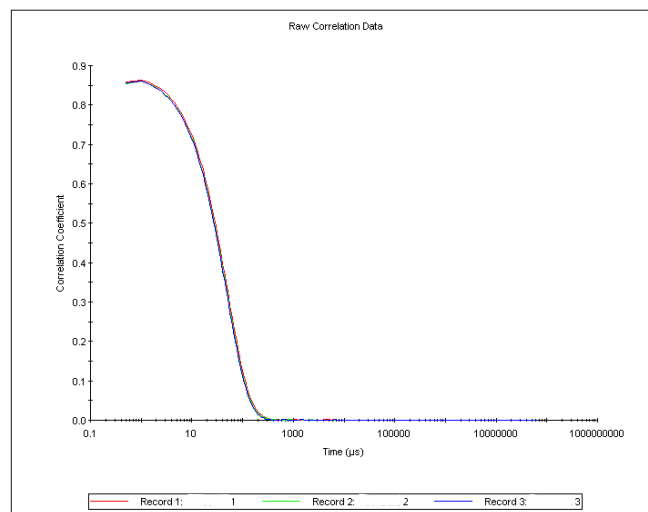
○ Medida 1



○ Medida 2



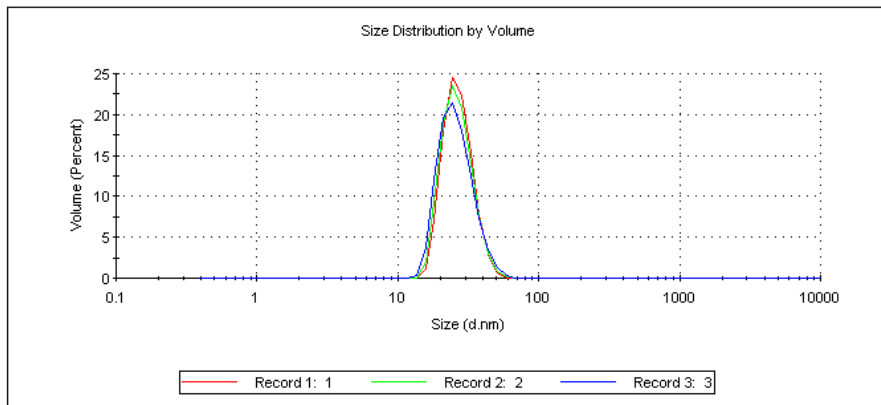
○ Medida 3



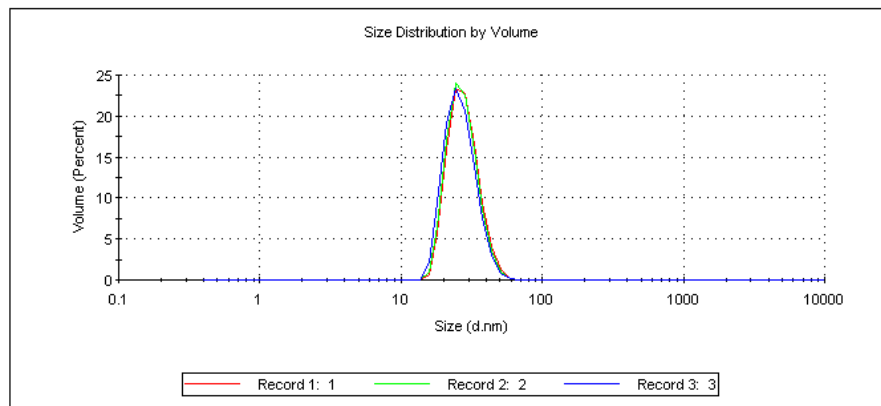
▪ $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{S50160}$

▪ Volumen:

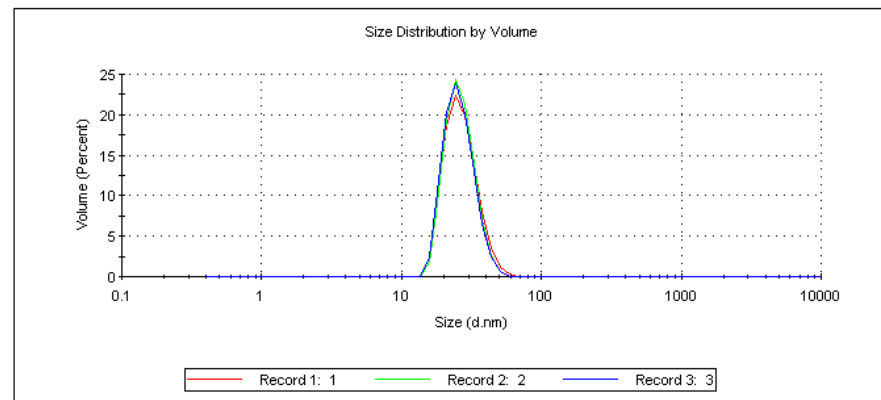
○ Medida 1



○ Medida 2

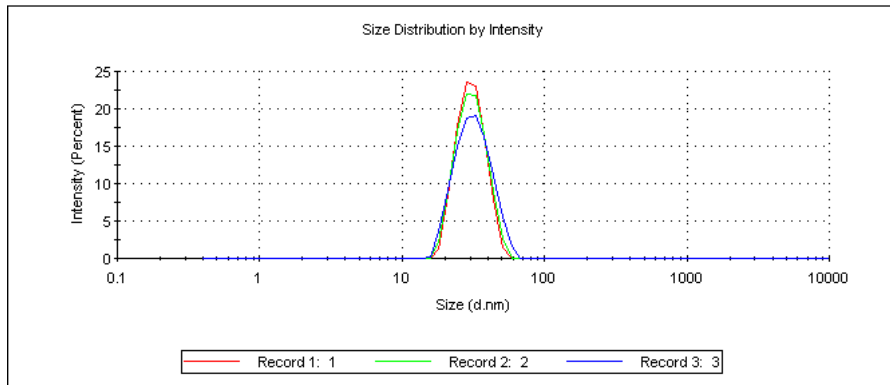


○ Medida 3

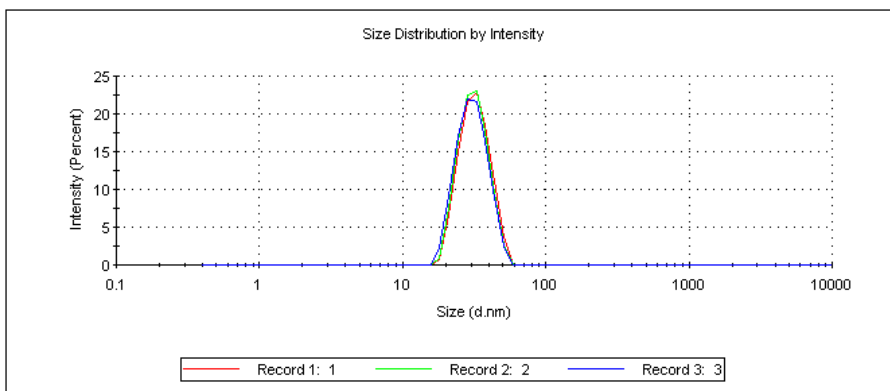


▪ Intensidad:

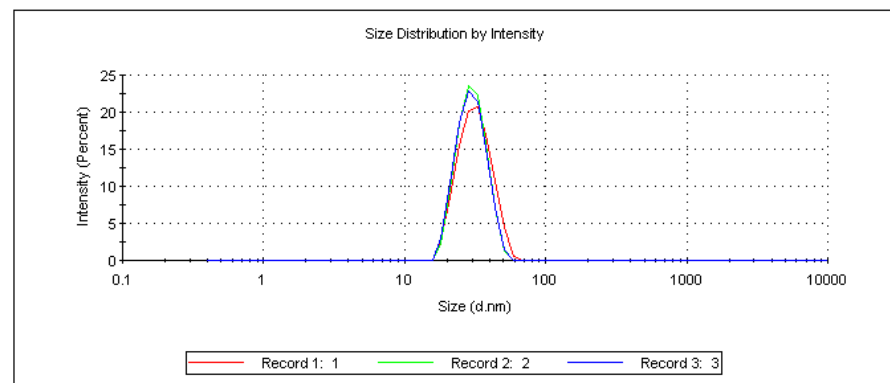
○ Medida 1



○ Medida 2

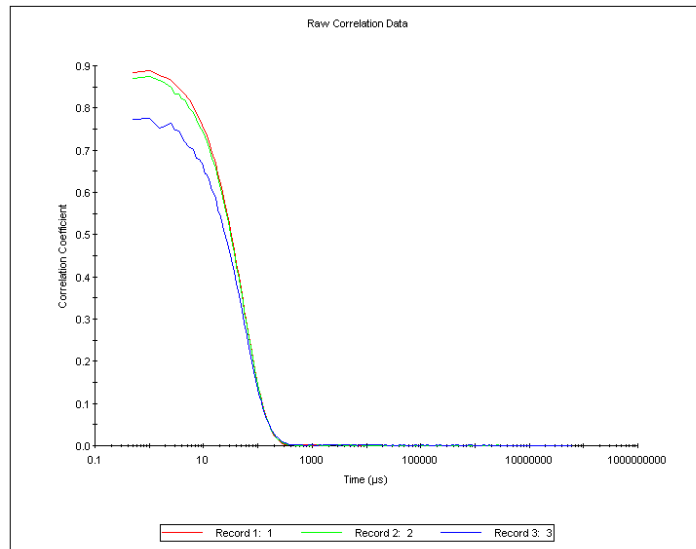


○ Medida 3

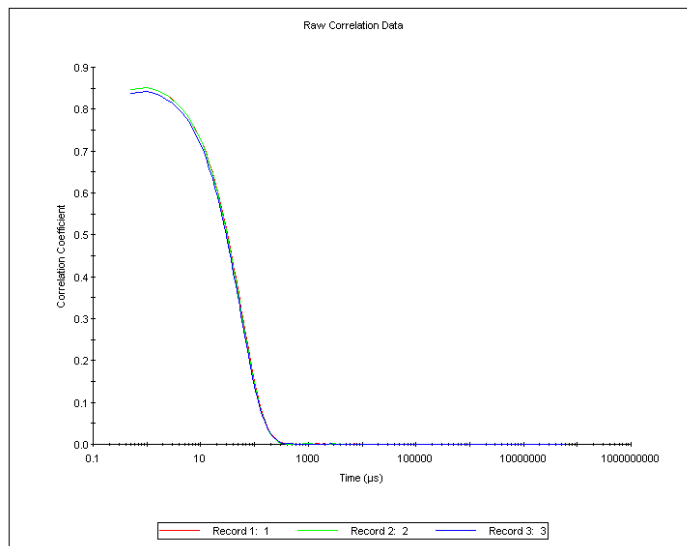


■ Correlogramas:

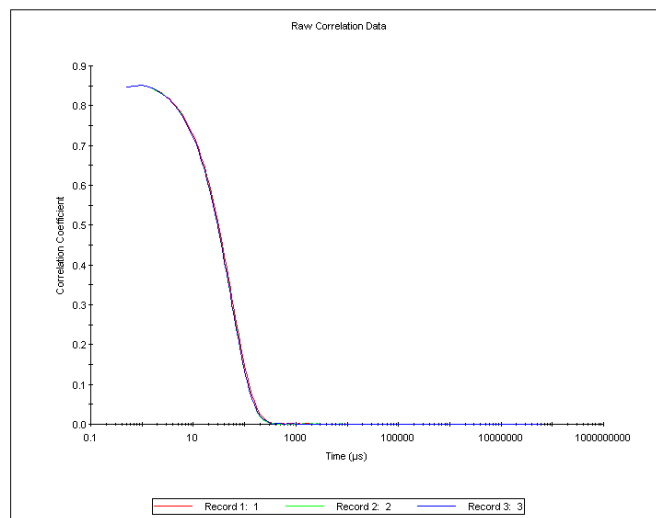
○ Medida 1



○ Medida 2



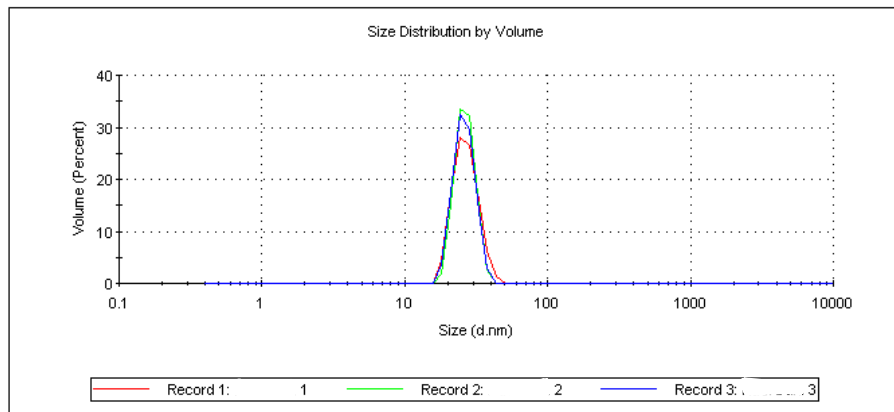
○ Medida 3



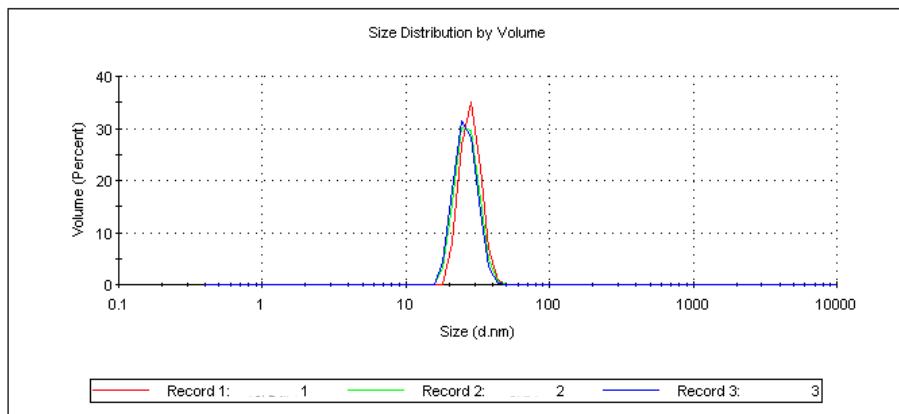
▪ **NaHCO₃ + S₅₀l60**

▪ Volumen:

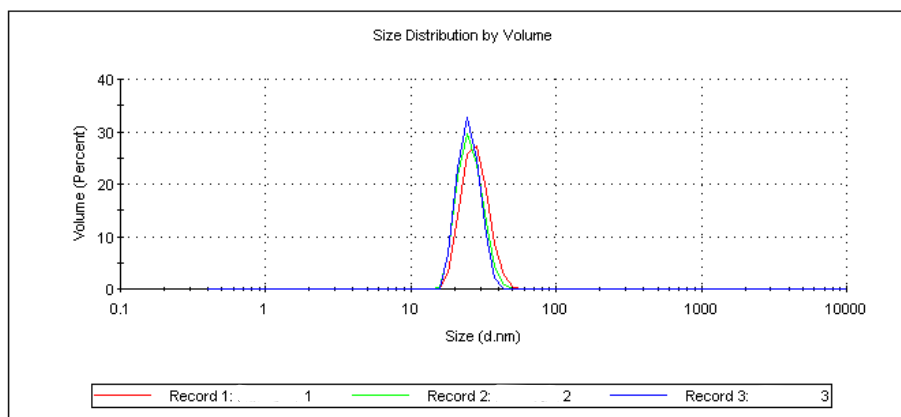
○ Medida 1



○ Medida 2

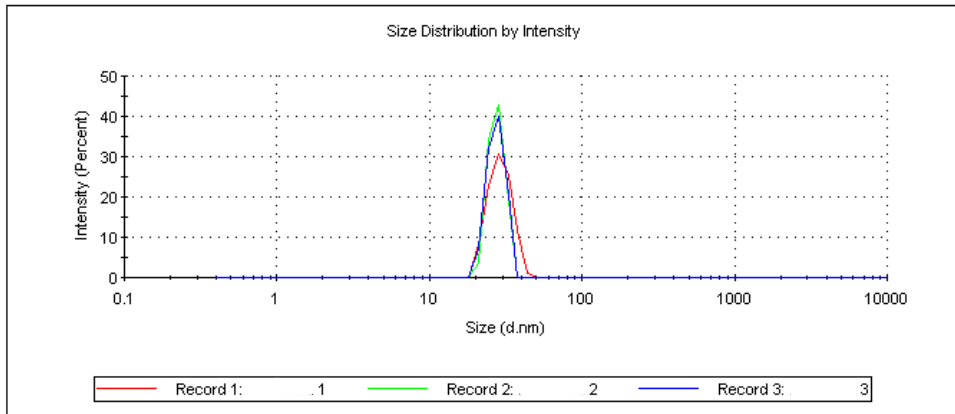


○ Medida 3

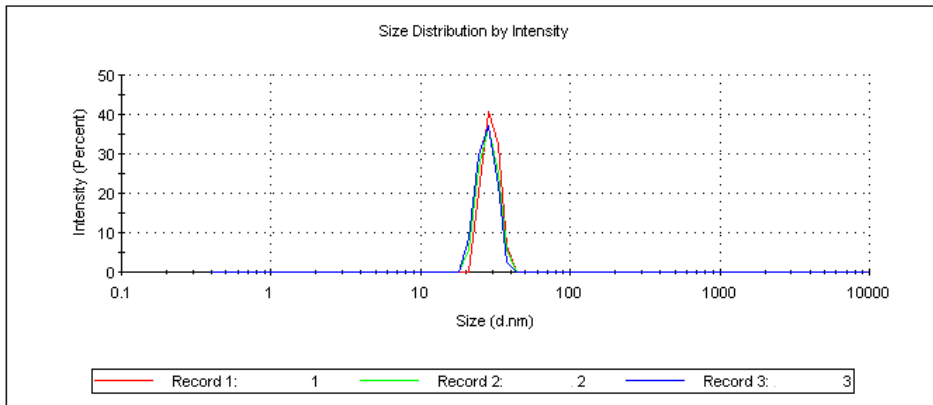


▪ Intensidad:

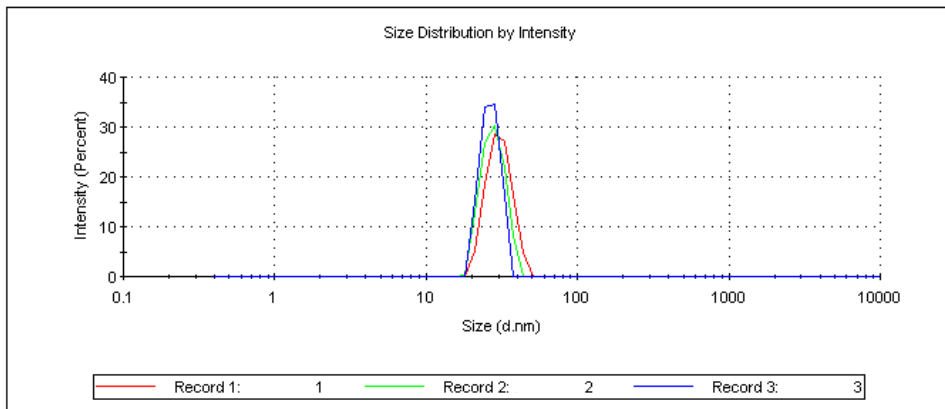
○ Medida 1



○ Medida 2

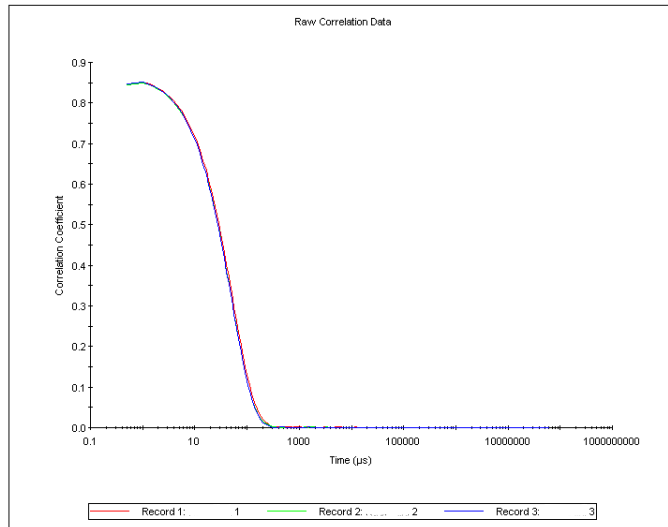


○ Medida 3

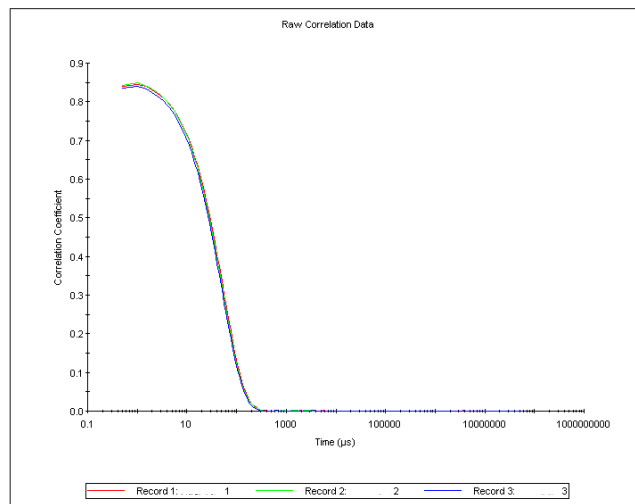


■ Correlogramas:

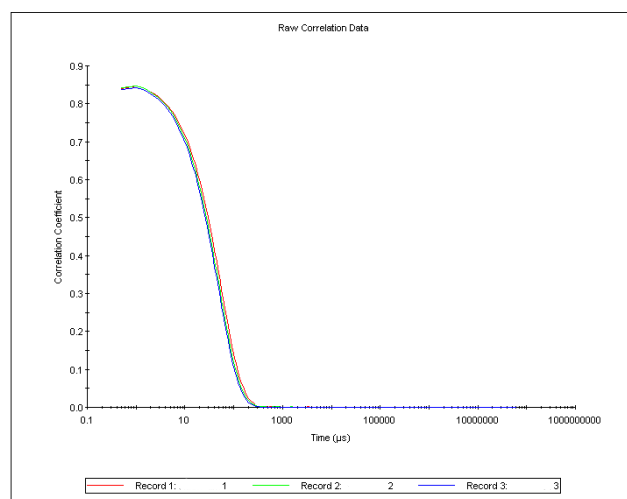
○ Medida 1



○ Medida 2



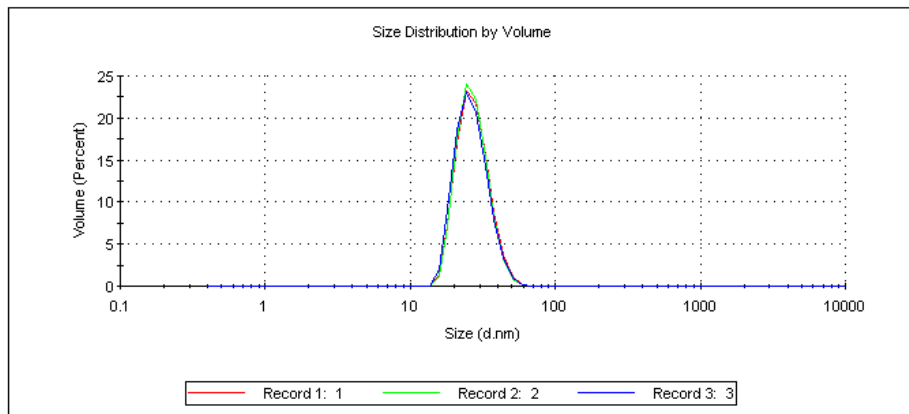
○ Medida 3



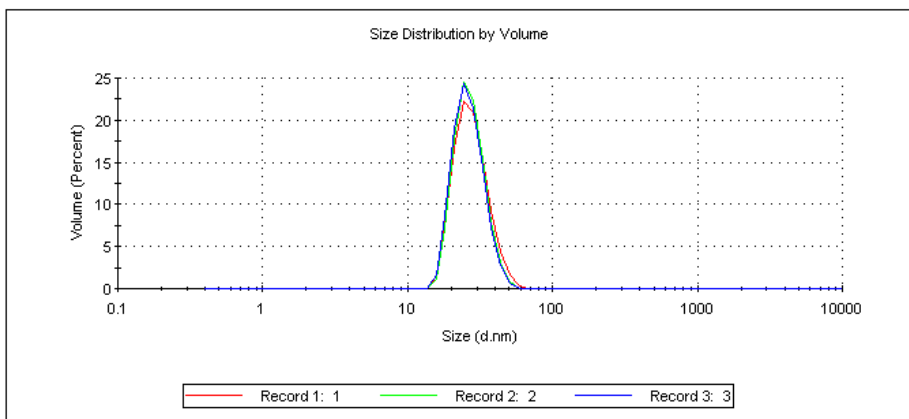
▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{S}_{50160}$

▪ Volumen:

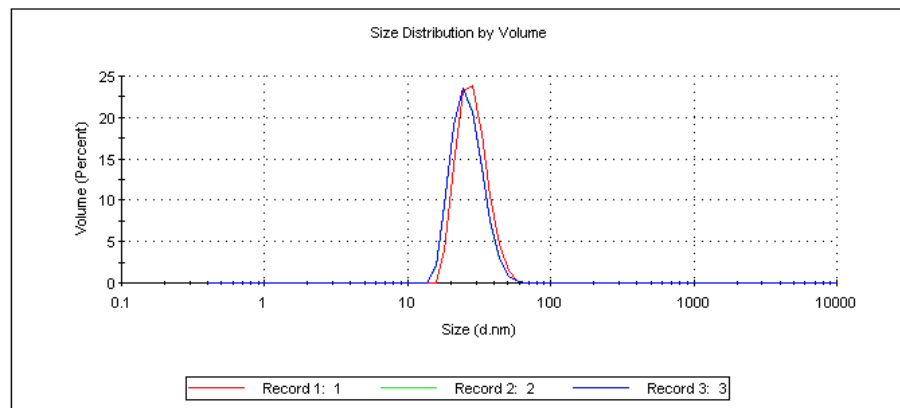
○ Medida 1



○ Medida 2

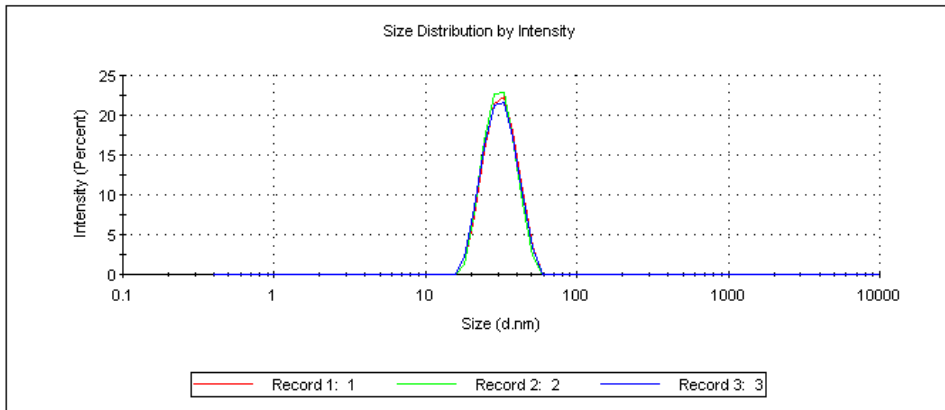


○ Medida 3

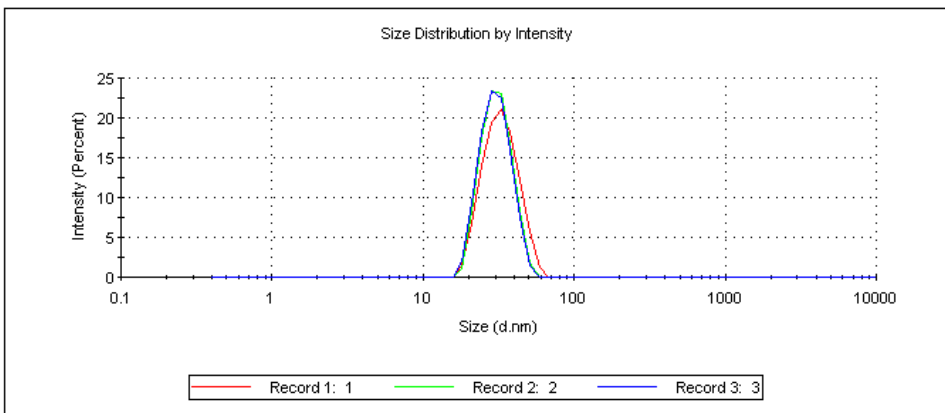


▪ Intensidad:

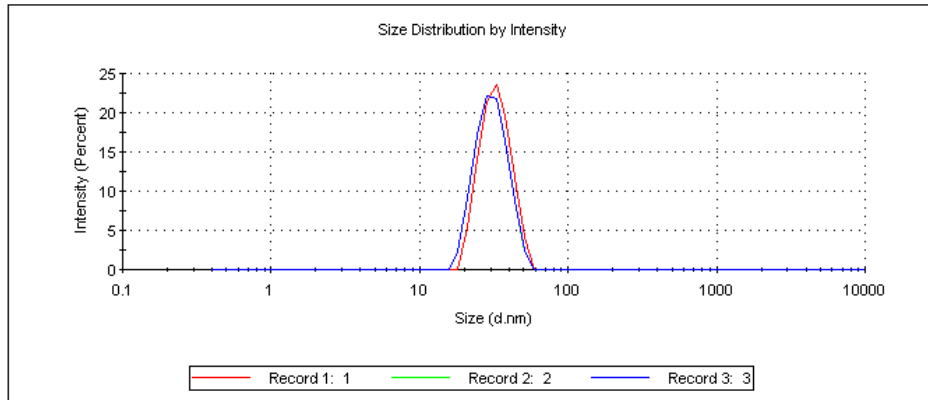
○ Medida 1



○ Medida 2

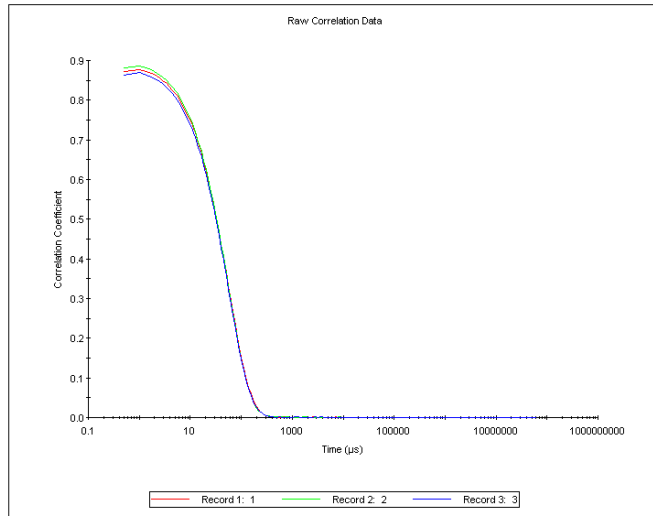


○ Medida 3

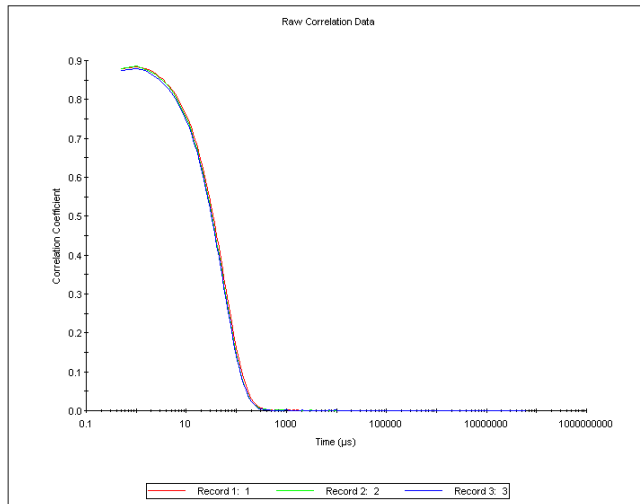


■ Correlogramas:

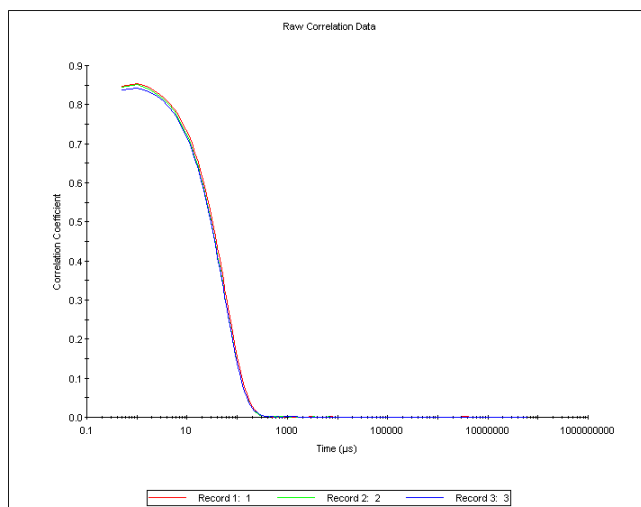
○ Medida 1



○ Medida 2



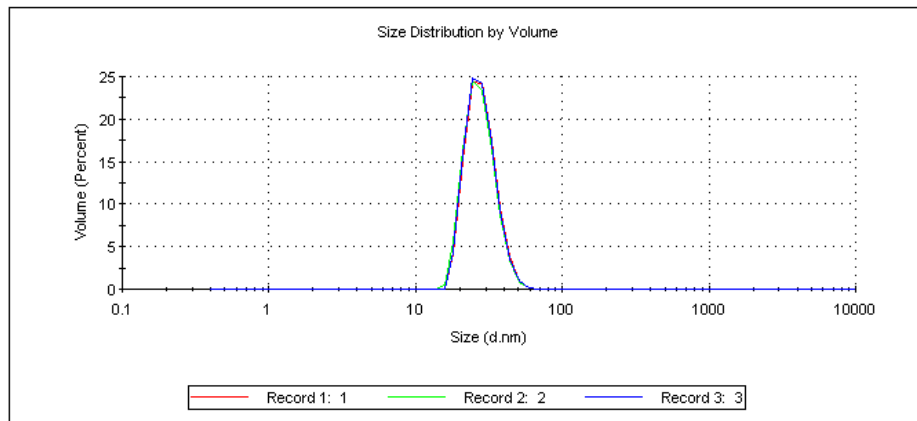
○ Medida 3



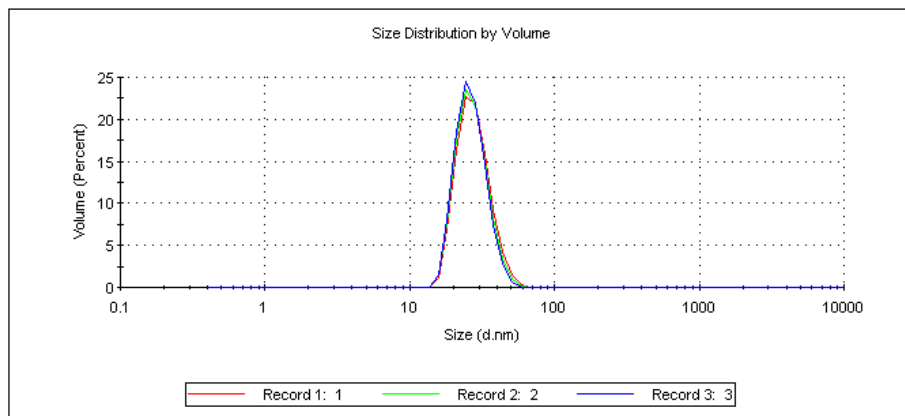
▪ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{S}_{50160}$

▪ Volumen:

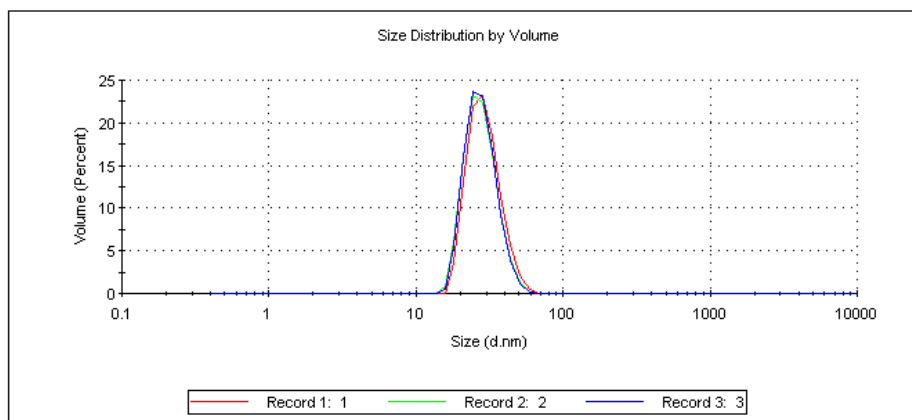
○ Medida 1



○ Medida 2

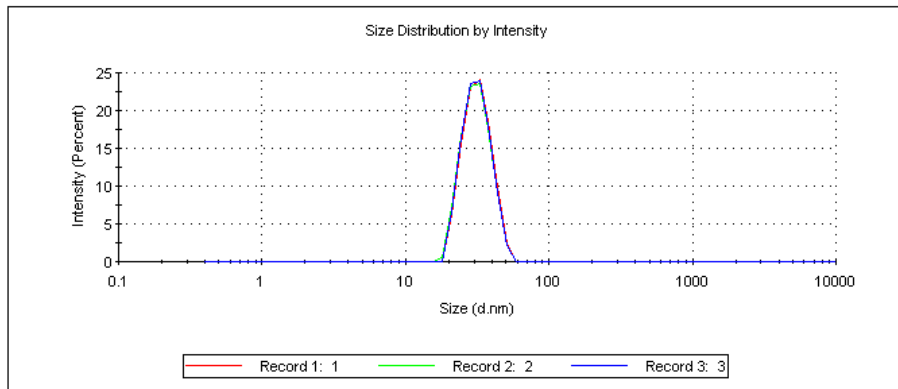


○ Medida 3

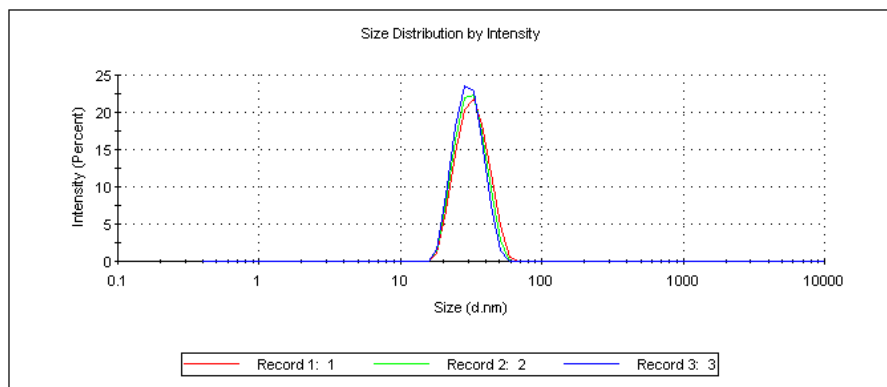


▪ Intensidad:

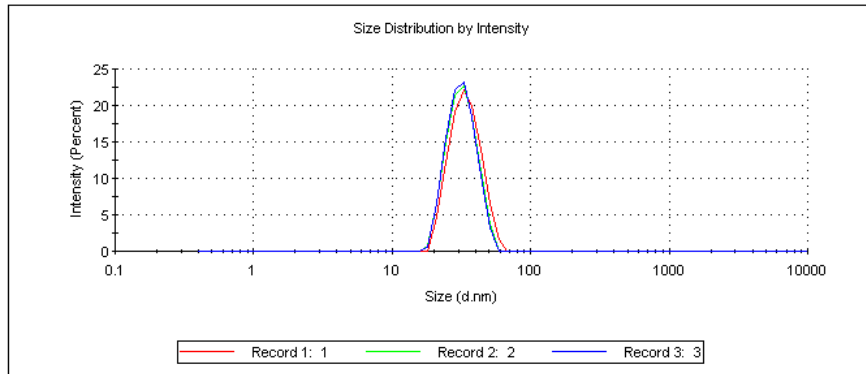
○ Medida 1



○ Medida 2

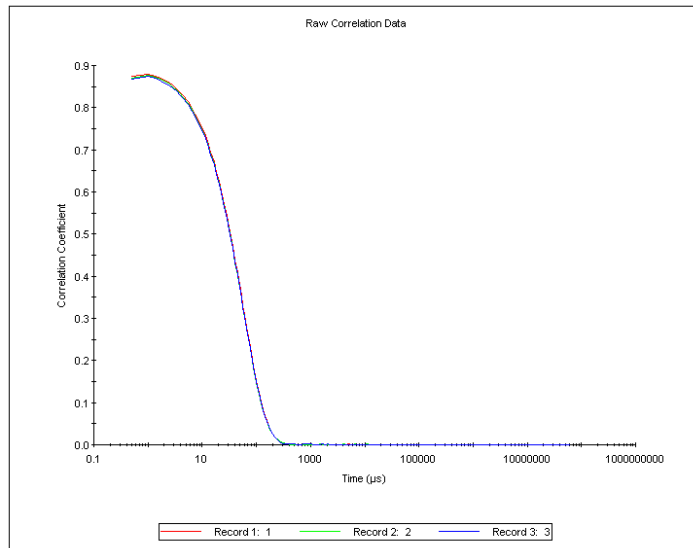


○ Medida 3

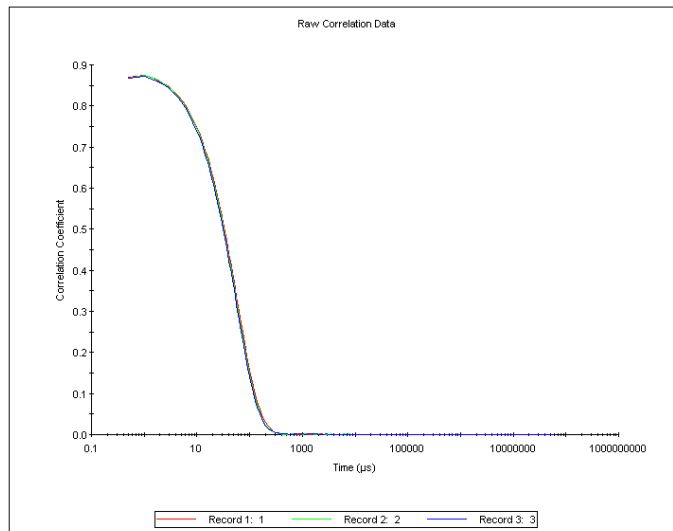


■ Correlogramas:

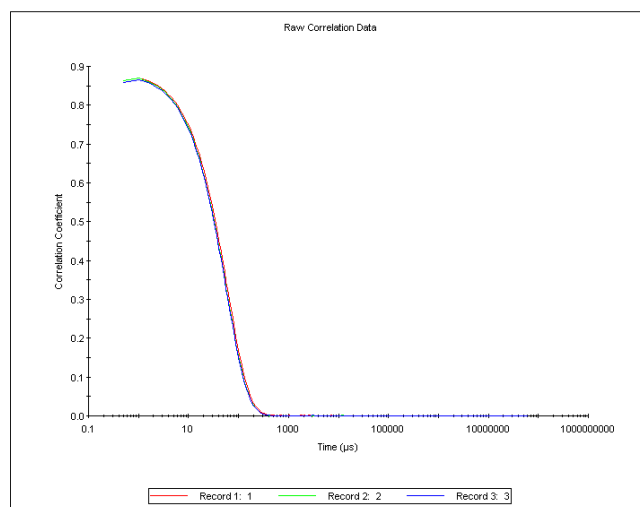
○ Medida 1



○ Medida 2



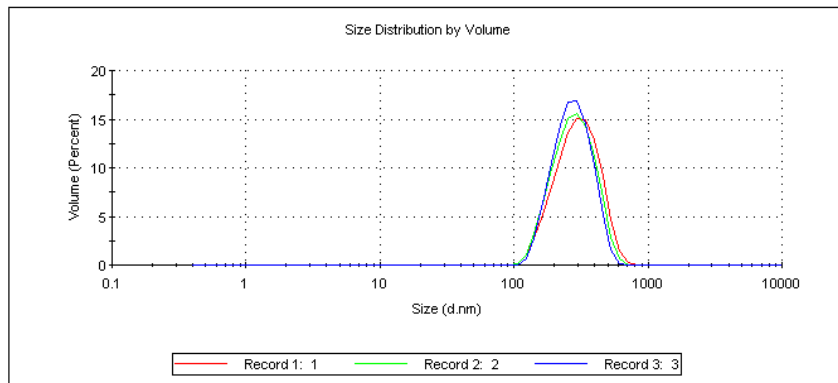
○ Medida 3



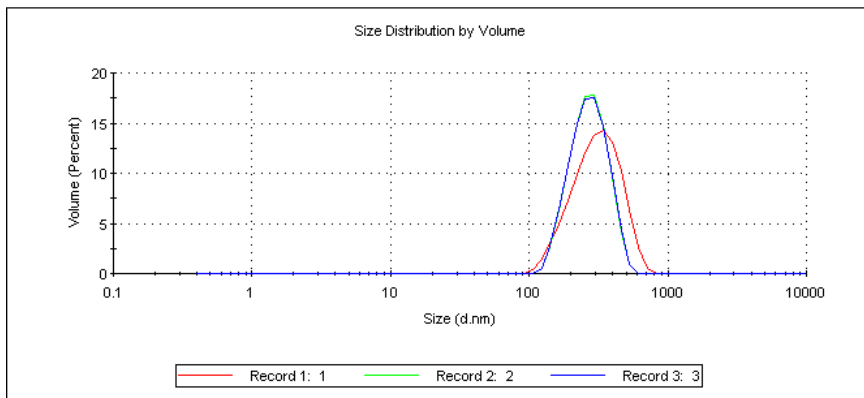
▪ $\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{S}_{50160}$

▪ Volumen:

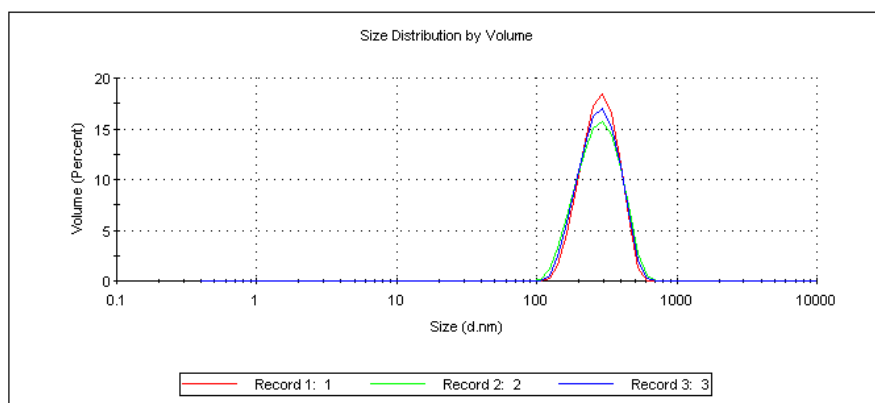
○ Medida 1



○ Medida 2

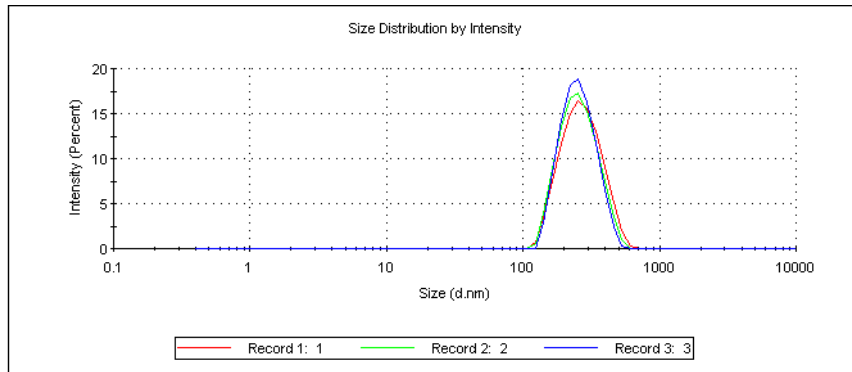


○ Medida 3

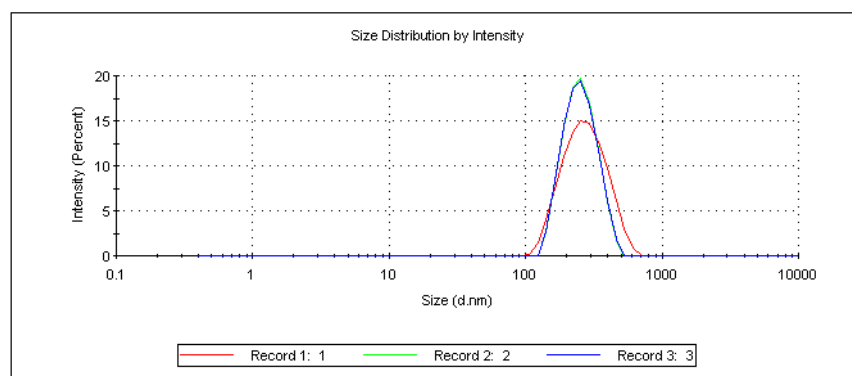


▪ Intensidad:

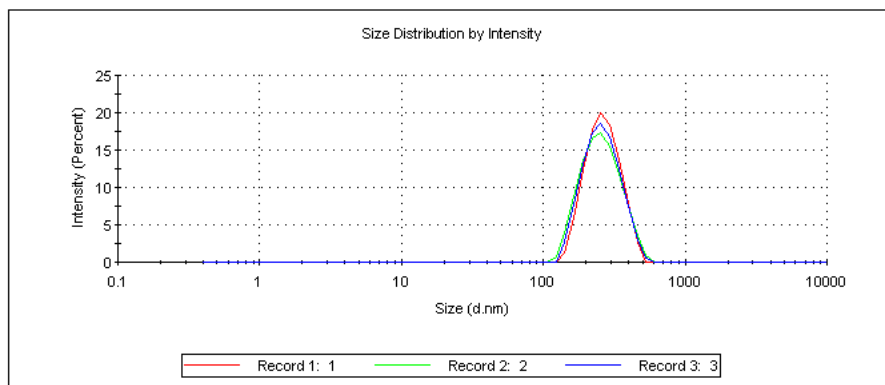
○ Medida 1



○ Medida 2

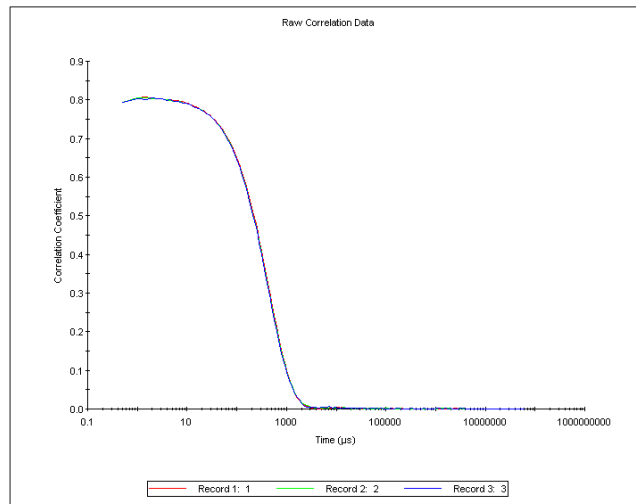


○ Medida 3

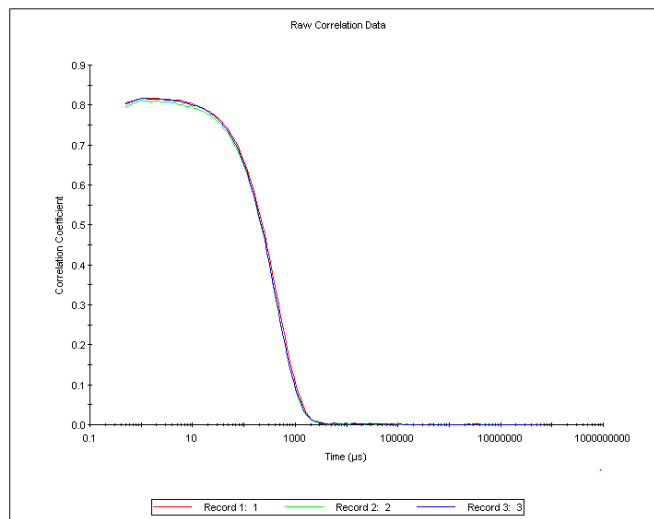


■ Correlogramas:

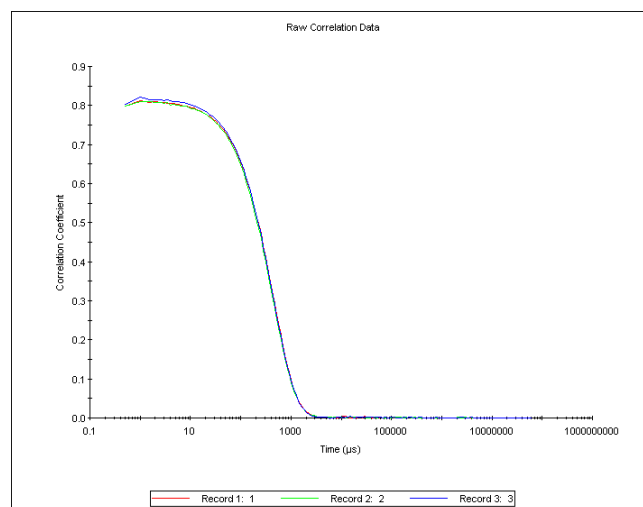
○ Medida 1



○ Medida 2



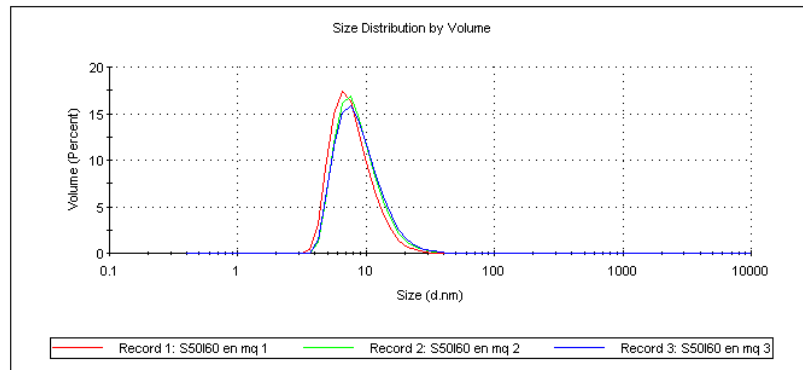
○ Medida 3



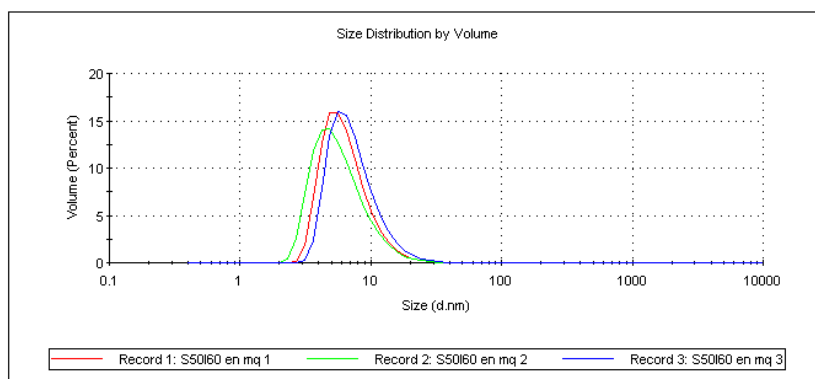
- S50160 pH=7,5

- Volumen:

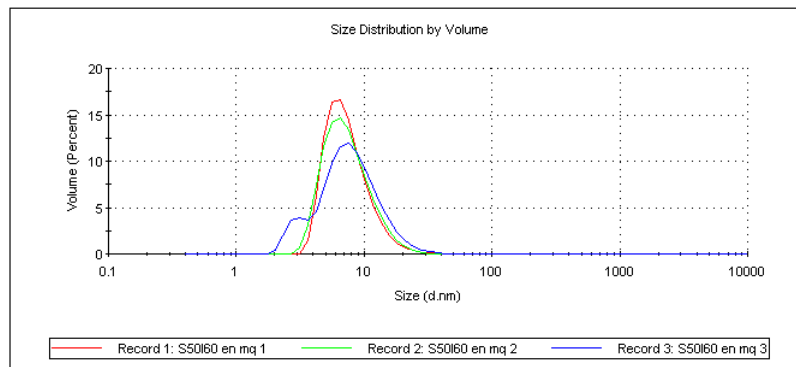
- Medida 1



- Medida 2

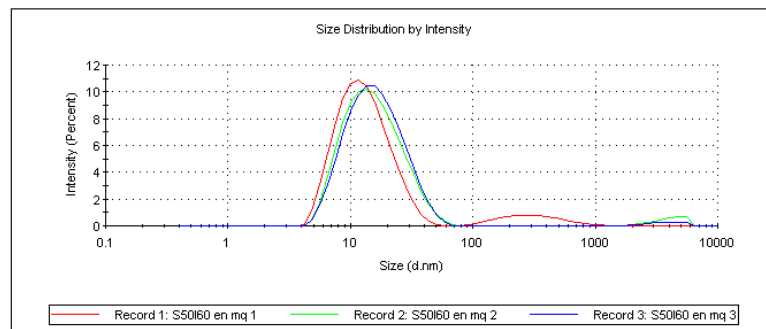


- Medida 3

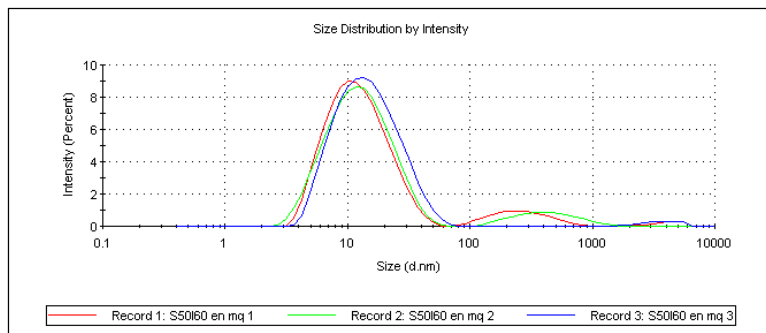


- Intensidad:

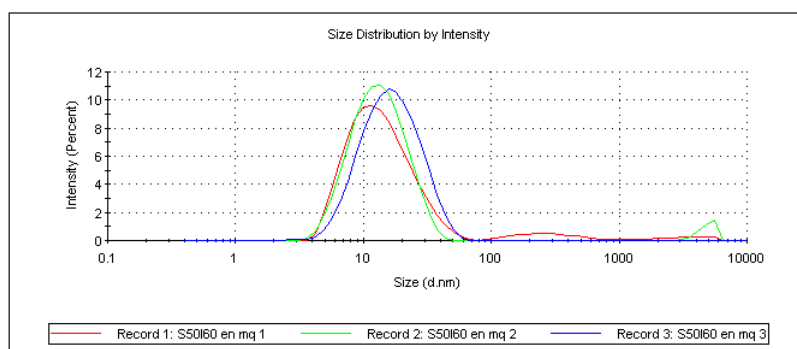
- Medida 1



- Medida 2

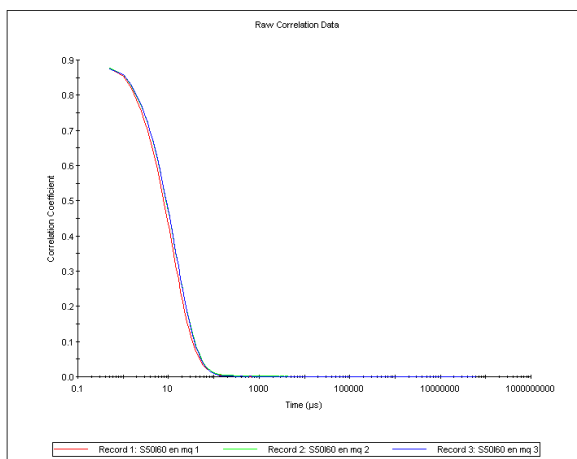


○ Medida 3

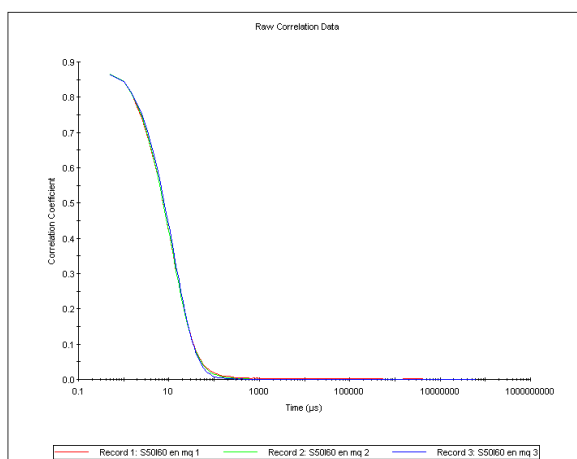


■ Correlogramas:

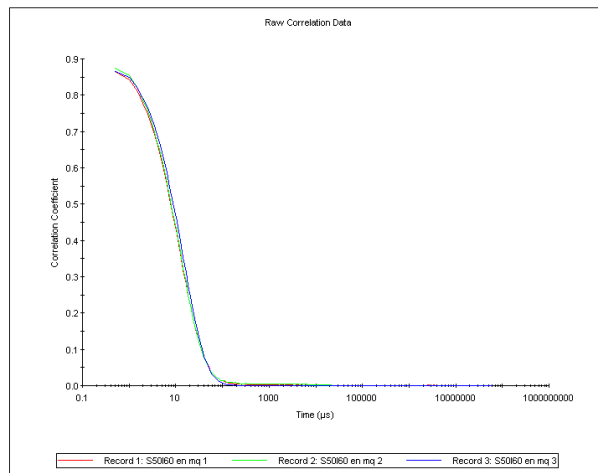
○ Medida 1



○ Medida 2



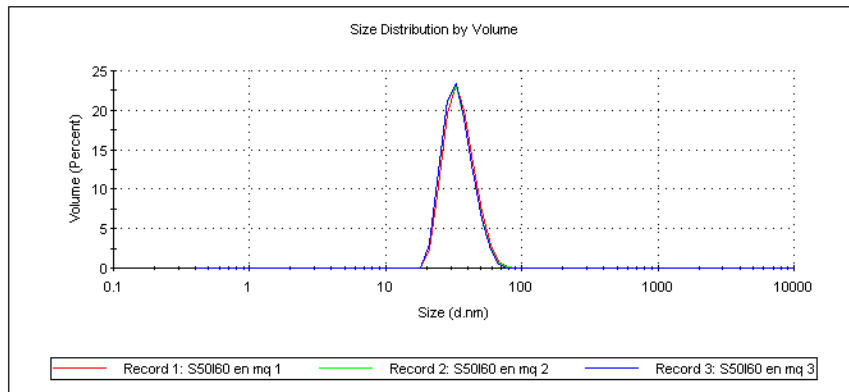
○ Medida 3



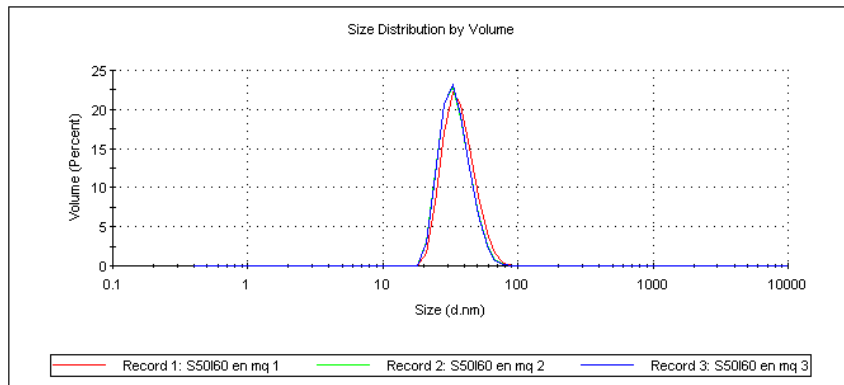
▪ S₅₀₁₆₀ pH=12

▪ Volumen:

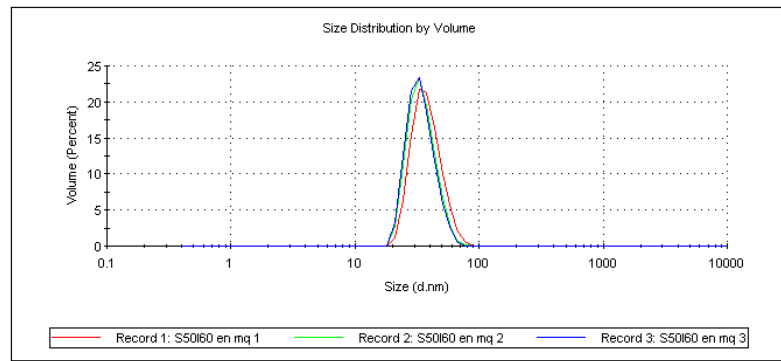
○ Medida 1



○ Medida 2

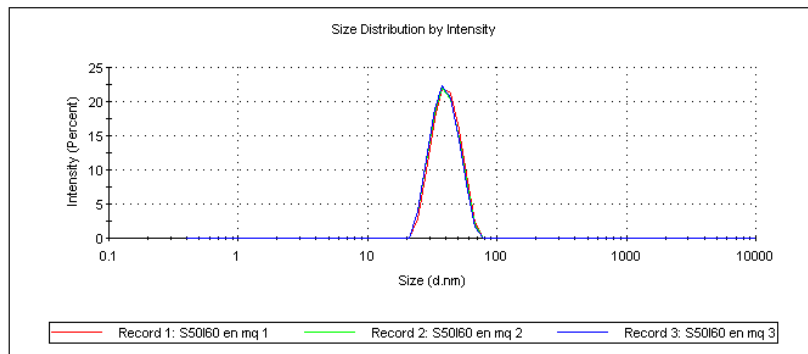


○ Medida 3

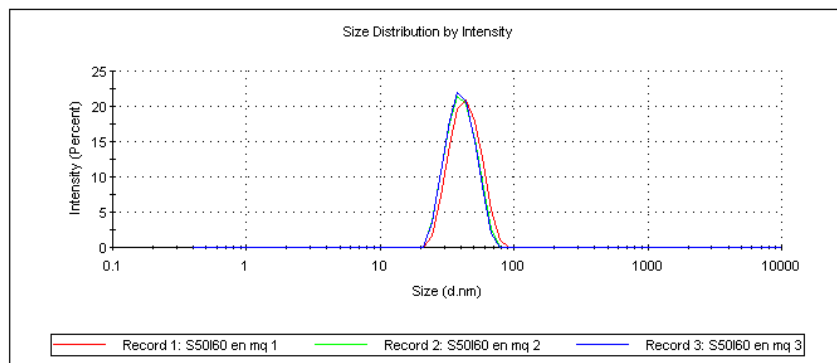


■ Intensidad:

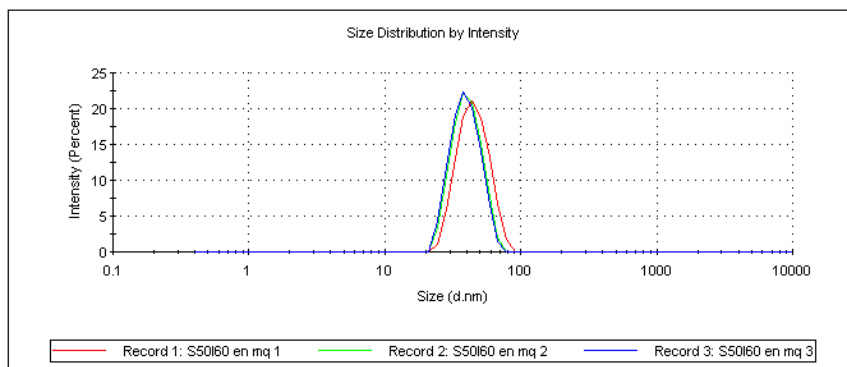
○ Medida 1



○ Medida 2

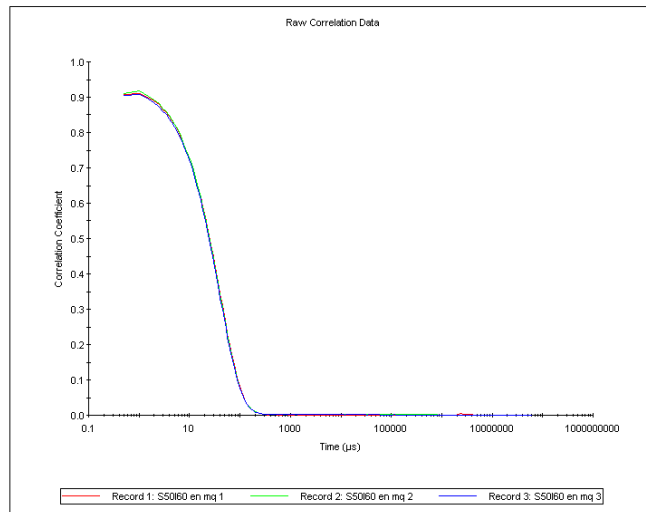


○ Medida 3

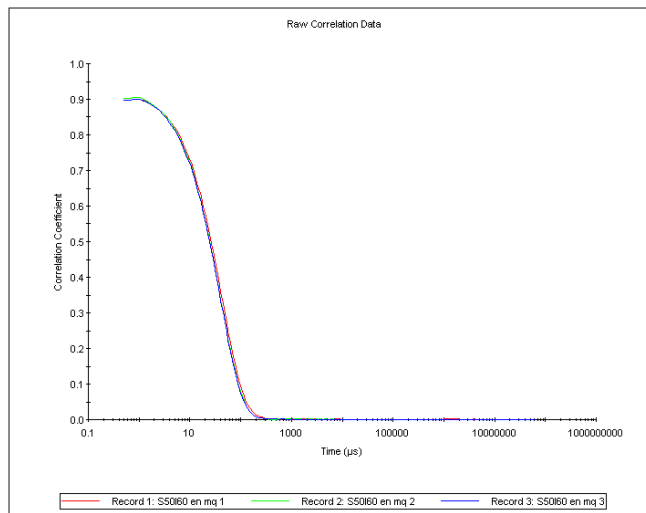


■ Correlogramas:

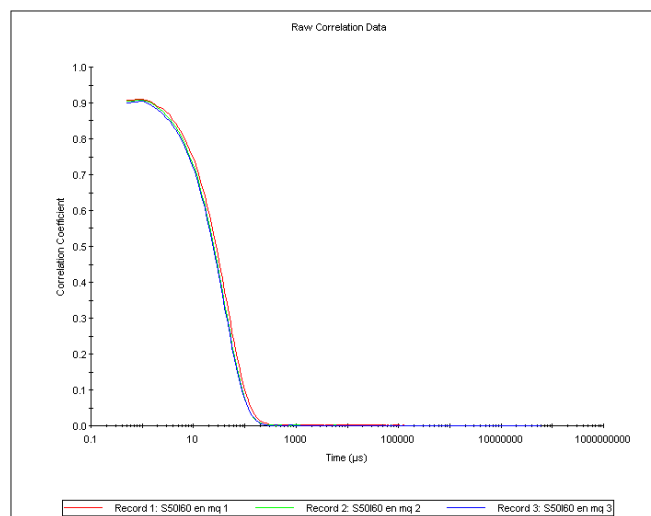
○ Medida 1



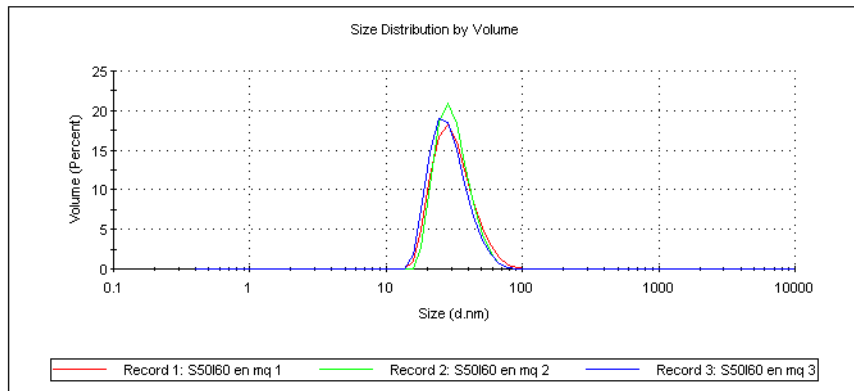
○ Medida 2



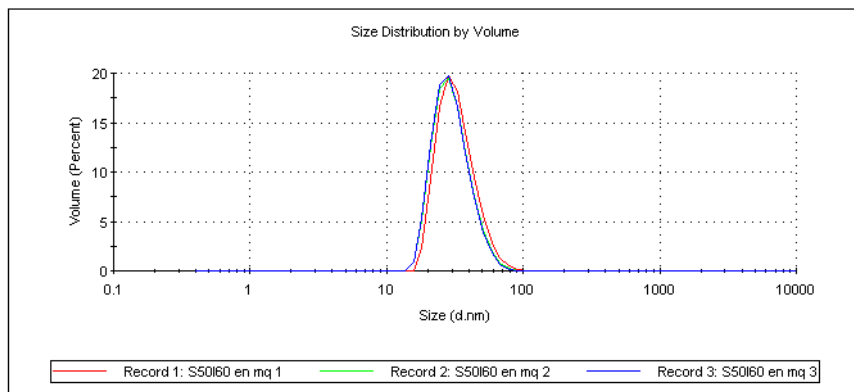
○ Medida 3



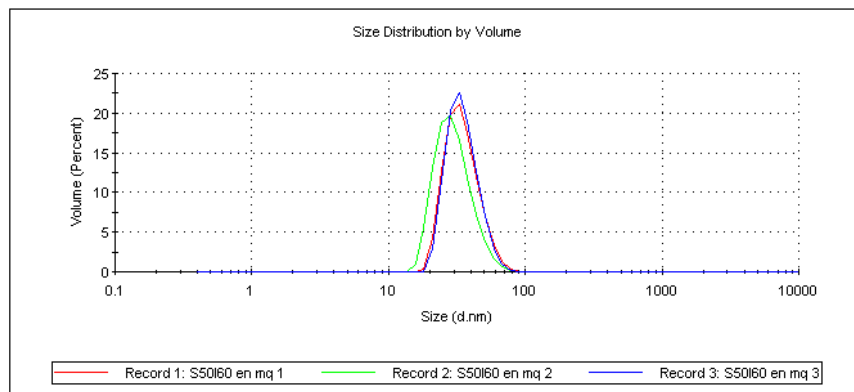
- S50160 pH=4
 - Volumen:
 - Medida 1



- Medida 2

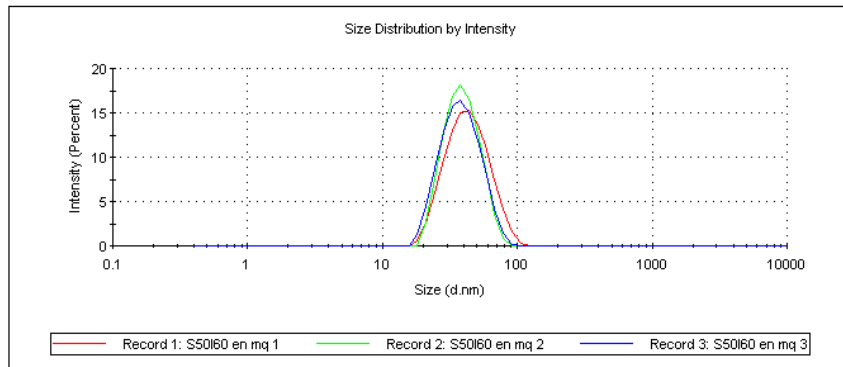


- Medida 3

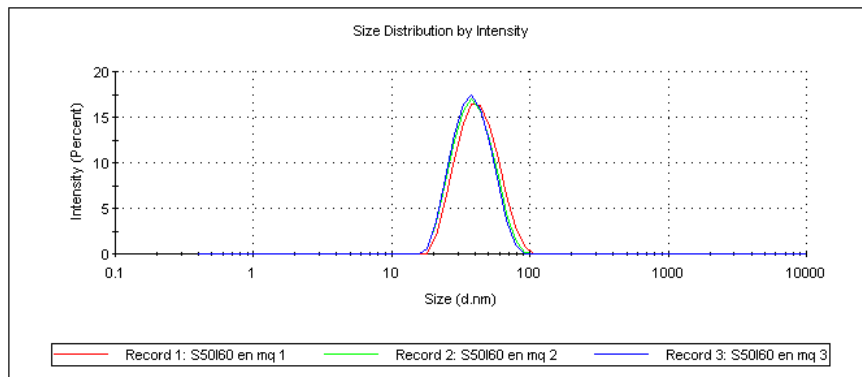


▪ Intensidad:

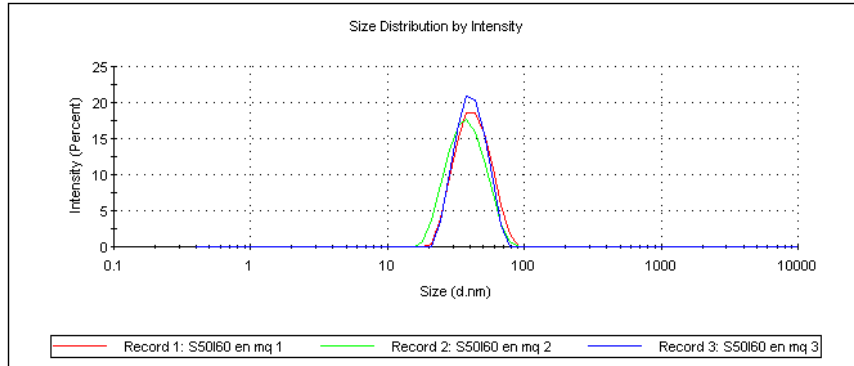
○ Medida 1



○ Medida 2

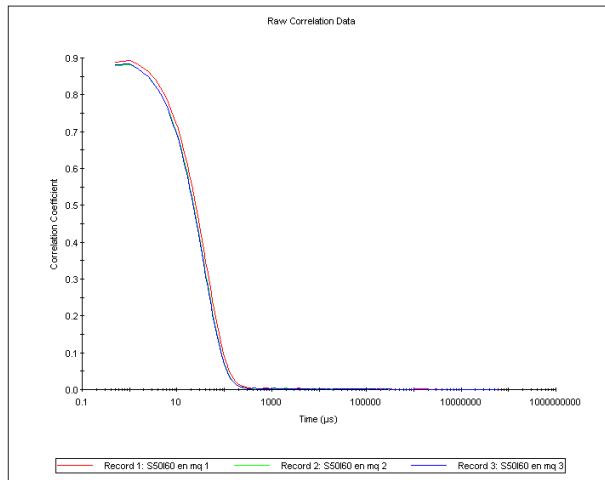


○ Medida 3

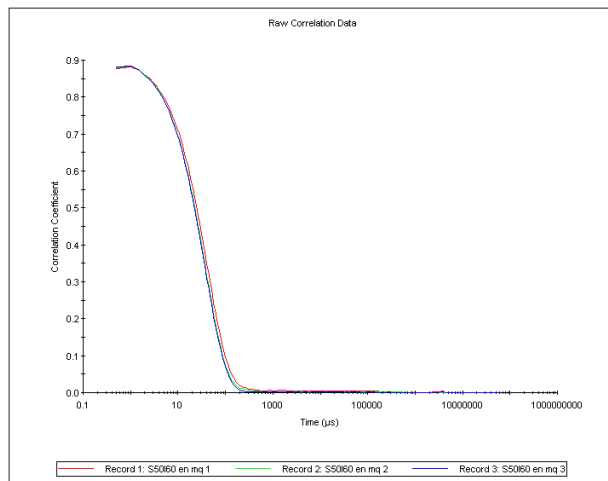


■ Correlogramas:

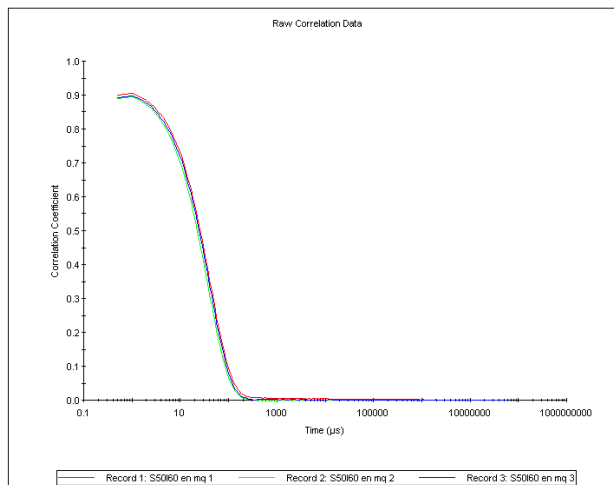
○ Medida 1



○ Medida 2



○ Medida 3



10.4. pH de las muestras.

Muestra	pH
NaCl + S_{50l60}	5.41
Na₂CO₃ + S_{50l60}	11.00
NaHCO₃ + S_{50l60}	8.81
Na₂HPO₄ + S_{50l60}	8.20
NaH₂PO₄ + S_{50l60}	4.46
Na₃PO₄ + S_{50l60}	12.45
S_{50l60}	7.50

10.5. S_{50l60}

10.5.1. Tamaño de partícula y Pdi

Muestra	Medida	Tamaño de partícula (nm)	Tamaño de partícula medio (nm)	Desviación estandar
S_{50l60} pH=12	1	34.97	35.58	0.54
	2	35.77		
	3	35.99		
S_{50l60} pH=7,5	1	11.17	9.61	1.76
	2	7.70		
	3	9.97		
S_{50l60} pH=4	1	33.70	32.26	1.25
	2	31.70		
	3	31.39		

Muestra	Medida	Pdi	Pdi medio	Desviación estandar
S_{50l60} pH=12	1	0.04	0.04	0.01
	2	0.05		
	3	0.04		
S_{50l60} pH=7,5	1	0.23	0.25	0.02
	2	0.27		
	3	0.24		
S_{50l60} pH=4	1	0.07	0.09	0.02
	2	0.11		
	3	0.10		

10.5.2. Potencial z

Muestra	Medida	Potencial z (mV)	Potencial z medio (mV)	Desviación estandar
S_{50l60} pH=12	1	-11.40	-11.32	1.72
	2	-9.56		
	3	-13.00		
S_{50l60} pH=7,5	1	-11.40	-11.77	1.00
	2	-12.90		
	3	-11.00		
S_{50l60} pH=4	1	-6.89	-7.72	0.74
	2	-7.99		
	3	-8.29		