



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

NANOFIBRAS POLIMÉRICAS CON ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO: PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

Autora: Ágata Arias Sánchez
Modalidad: Experimental
Tutor: Dr. Ricardo Mallavia Marín

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. NANOFIBRAS

2.2. FABRICACIÓN DE NANOFIBRAS

2.2.1. *Electrospinning*

2.2.2. Materiales poliméricos

2.2.2.1. Copolímeros del ácido maleico y el metil vinil éter

2.2.2.2. Bromuro de poli{{9,9-bis[6' (N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7 -fluoreno}-*alt*-1,4-fenilideno} (PTMAH-FF)

2.3. ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO Y TERAPIA FOTODINÁMICA

2.4. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

3. OBJETIVOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS

4.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS

4.3. PREPARACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

4.4.1. Microscopía óptica y de fluorescencia

4.4.2. Espectroscopía de fluorescencia

4.5. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

4.5.1. Procedimiento experimental

4.5.2. Diseño de los ensayos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

5.1.1. Microscopía óptica y de fluorescencia

5.1.2. Espectroscopía de fluorescencia

5.2. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

5.2.1. Recta de calibrado del ácido 5-aminolevulínico

5.2.2. Cinética de liberación

6. CONCLUSIONES

7. ANEXOS

1. RESUMEN

Se han elaborado nanofibras poliméricas biocompatibles y biodegradables de poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-AC) y poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-ES) mediante la técnica de *electrospinning*. Todas las nanofibras elaboradas se han caracterizado morfológicamente mediante microscopía óptica para evaluar si la adición de otros compuestos a las nanofibras afecta a su estructura.

Se ha adicionado a las nanofibras poliméricas un polielectrolito conjugado, el bromuro de poli{9,9-bis[6'(N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-fluoreno}-*alt*-1,4-fenilideno} al 0,75% p/p y se han caracterizado mediante microscopía óptica de fluorescencia y espectroscopía de fluorescencia. Este polielectrolito aporta fluorescencia a las nanofibras y además confiere carga iónica a la disolución polimérica, facilitando el proceso de *electrospinning*.

Asimismo se ha adicionado un 20% p/p del fármaco fotosensibilizador ácido 5-aminolevulínico (ALA) con posible aplicación en terapia fotodinámica. Se ha evaluado la idoneidad de las nanofibras elaboradas como sistema de liberación de fármacos por vía tópica, realizando un estudio preliminar de la cinética de liberación *in vitro* del ALA formulado en las nanofibras poliméricas. La metodología empleada han sido las celdas de Franz, con un seguimiento analítico del ALA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A través de estos ensayos se ha comparado la liberación del fármaco ALA desde las nanofibras con respecto a una formulación de referencia con ALA (una disolución polimérica viscosa). El estudio se llevó a cabo para ambos polímeros, el PMVEMA-AC y el PMVEMA-ES, incluyendo también nanofibras que incorporaban el polielectrolito conjugado fluorescente.

En resumen, este Trabajo Fin de Grado se han procesado y optimizado nanofibras poliméricas cargadas de ácido 5-aminolevulínico y su posible aplicación como sistema de liberación de fármacos en terapia fotodinámica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. NANOFIBRAS

Las nanofibras se caracterizan por presentar un diámetro inferior a 1µm, generalmente entre 50 y 500nm. Su tamaño les confiere una elevada relación superficie/volumen, poseen una alta porosidad y un pequeño tamaño de poro. Además, los sistemas nanoestructurados manifiestan unas propiedades de superficie diferentes a los materiales convencionales.

Para su uso en biomedicina un requisito inicial es que las nanofibras estén compuestas de materiales biocompatibles que hayan demostrado no presentar toxicidad sobre los tejidos y organismos vivos. Con este fin se emplean mayoritariamente polímeros sintéticos (poliésteres, polialcoholes, poliéteres y polianhídridos) o biopolímeros (quitina y quitosán, colágeno, fibroína de seda o celulosa).

Con respecto a las aplicaciones terapéuticas actualmente en desarrollo cabe destacar la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, donde se utilizan las nanofibras para fabricar estructuras tridimensionales porosas y ordenadas que simulan la matriz extracelular y estimulan el crecimiento celular. Se han utilizado con éxito tanto para la fabricación de tejidos *in vitro* como para la regeneración *in vivo* de heridas y lesiones músculo-esqueléticas^{1,2}.

Por otro lado, las nanofibras son de interés en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas para la vía tópica, generalmente en forma de apósitos, parches transdérmicos o implantes biodegradables³. Se ha estudiado especialmente la vehiculización y liberación de: factores de crecimiento, genes y células madre para medicina regenerativa^{2,4}, antibióticos para profilaxis de infecciones

1 Ma B, Xie J, Jiang J, Shuler FD, Bartlett DE. Rational design of nanofiber scaffolds for orthopedic tissue repair and regeneration. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(9):1459-81.

2 Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, Fioretti F, et al. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1061-75.

3 Xie J, Li X, Xia Y. Putting Electrospun Nanofibers to Work for Biomedical Research. *Macromol Rapid Commun*. 2008;29(22):1775-1792.

4 Ji W, Sun Y, Yang F, van den Beucken JJ, Fan M, Chen Z, et al. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharm Res*. 2011;28(6):1259-72.

asociadas a prótesis^{5,6} y antitumorales cuando se prefiere un efecto local para aumentar la eficacia y minimizar toxicidad sistémica^{7,8}. En este Trabajo Fin de Grado (TFG) se ha empleado el ácido 5-aminolevulínico (ALA), que es un fotosensibilizador para terapia fotodinámica clasificado como antineoplásico.

2.2. FABRICACIÓN DE NANOFIBRAS

2.2.1. *Electrospinning*

La electrohilatura o *electrospinning* es la técnica más utilizada para la elaboración de nanofibras poliméricas. Destaca por su versatilidad, sencillez, facilidad de implantación, coste-efectividad y posibilidad de escalado industrial. Permite obtener fibras de diversos diámetros, longitudes y porosidades (densidad y tamaño de poro). El control de las características morfológicas de las fibras se consigue ajustando los parámetros de *electrospinning*, que incluyen la disolución polimérica empleada y las condiciones experimentales⁹.

Las características del polímero (distribución de peso molecular y grado de dispersión) y el disolvente (volatilidad), junto con la concentración empleada, determinan las propiedades de la disolución polimérica, tales como conductividad, tensión superficial, extensibilidad y viscosidad. Las condiciones experimentales de *electrospinning* incluyen los parámetros operacionales (velocidad de flujo, distancia aguja-colector y voltaje aplicado) y ambientales (humedad relativa y temperatura).

Durante el proceso de *electrospinning* [Fig. 1], la disolución polimérica atraviesa la aguja de *electrospinning* y, sometida a tensión superficial, forma una gota en

- 5 Zhang L, Yan J, Yin Z, Tang C, Guo Y, Li D, et al. Electrospun vancomycin-loaded coating on titanium implants for the prevention of implant-associated infections. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3027-36.
- 6 Hsu YH, Chen DW, Tai CD, Chou YC, Liu SJ, Ueng SW, et al. Biodegradable drug-eluting nanofiber-enveloped implants for sustained release of high bactericidal concentrations of vancomycin and ceftazidime: in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4347-55.
- 7 Amna T, Hassan MS, Nam KT, Bing YY, Barakat NA, Khil MS, et al. Preparation, characterization, and cytotoxicity of CPT/Fe₂O₃-embedded PLGA ultrafine composite fibers: a synergistic approach to develop promising anticancer material. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1659-70.
- 8 Yoo JJ, Kim C, Chung CW, Jeong YI, Kang DH. 5-aminolevulinic acid-incorporated poly(vinyl alcohol) nanofiber-coated metal stent for application in photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1997-2005.
- 9 Chakraborty S, Liao IC, Adler A, Leong KW. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(12):1043-54.

el extremo de la aguja. Al aplicarse sobre una solución conductora un voltaje superior a la tensión superficial la gota se distorsiona formando el cono de Taylor, que emite un chorro (*jet*) en dirección al colector. El *jet* está sometido a inestabilidades y, a medida que el disolvente se evapora a lo largo del *jet*, las fibras se forman y se depositan en un colector.

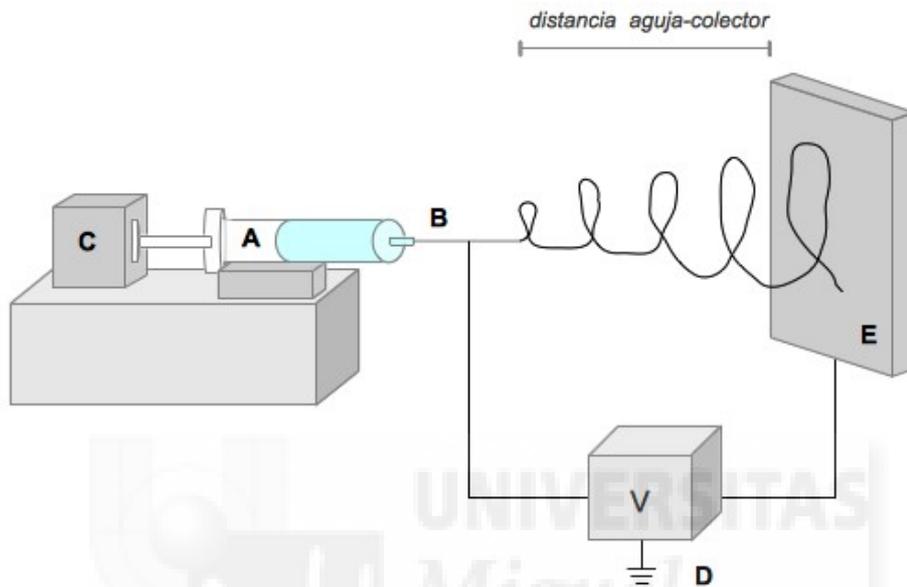


Figura 1. Esquema de electrospinning. (A) Jeringa con disolución polimérica. (B) Aguja de electrospinning. (C) Bomba de infusión. (D) Fuente de alta tensión. (E) Colector de aluminio.

Mediante la técnica de *electrospinning* se pueden elaborar nanofibras poliméricas que contengan fármacos con una alta eficiencia de encapsulación y que presenten diferentes cinéticas de liberación, desde la liberación inmediata hasta la liberación sostenida a lo largo de días o semanas^{2,4,5}. Existen varias técnicas de incorporación de fármacos a nanofibras poliméricas, y la estrategia que se escoja es uno de los principales factores que determinará la cinética de liberación del fármaco.

En primer lugar, la adsorción física del fármaco en las fibras se consigue sumergiendo las fibras en una disolución que contenga el fármaco. Es el procedimiento menos agresivo sobre el principio activo y que mejor conserva la actividad biológica de biomoléculas. Sin embargo, tiene como limitación una cinética de liberación generalmente errática y poco sostenida².

Por otro lado, se puede adicionar el fármaco a la disolución polimérica a partir de la cual se preparan las nanofibras mediante *electrospinning*. Esta estrategia de mezcla es la que se ha empleado en este Trabajo Fin de Grado (TFG), ya que permite incorporar el principio activo uniformemente a las nanofibras gracias a la elevada porosidad y relación superficie/volumen de éstas. Además, es posible recurrir a la variante de *electrospinning* mediante emulsión cuando los perfiles de solubilidad del fármaco y el polímero son inicialmente desfavorables³.

La técnica de *electrospinning* coaxial resulta en la encapsulación del fármaco en el interior de las nanofibras al emplear simultáneamente dos disoluciones, una conteniendo el fármaco y otra el recubrimiento polimérico, que se bombean a través de la misma aguja. Es la técnica que requiere el ajuste más complejo de los parámetros operacionales debido a que precisa regular dos sistemas de bombeo funcionando simultáneamente⁸.

Por último, la modificación de la superficie de las nanofibras uniendo covalentemente el fármaco al polímero está encaminada a la liberación sostenida del mismo¹⁰. La mayor dificultad es la derivatización del polímero para que una el fármaco de manera estable en las nanofibras pero que también sea capaz de liberarlo *in vivo* tras su administración.

Esta diversidad de técnicas en la elaboración de nanofibras contribuye a aumentar su atractivo como sistema de liberación de fármacos, ya que se puede adaptar en función de las características del fármaco y del polímero escogido y de las necesidades farmacocinéticas¹¹.

Otra ventaja de la técnica de *electrospinning* es que ofrece la posibilidad de incorporar varios fármacos simultáneamente u otros compuestos que modulen la liberación del fármaco⁷ y/o favorezcan su estabilidad². Asimismo se pueden adicionar coadyuvantes a fin de mejorar las propiedades de *electrospinning* de

10 Casper CL, Yamaguchi N, Kiick KL, Rabolt JF. Functionalizing electrospun fibers with biologically relevant macromolecules. *Biomacromolecules*. 2005;6(4):1998-2007.

11 Zamani M, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Advances in drug delivery via electrospun and electrospayed nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2997-3017.

la disolución polimérica o modificar las características de la nanofibras obtenidas.

2.2.2. Materiales poliméricos

Como materiales poliméricos biocompatibles para la elaboración de nanofibras en este Trabajo Fin de Grado se emplearon los copolímeros del ácido maleico y el metil vinil éter. Además, se elaboraron nanofibras que contenían un polielectrolito conjugado, el bromuro de poli{{9,9-bis[6' (N,N,N-trimetilamonio) hexilo]-2,7-fluoreno}-*alt*-1,4-fenilideno} (PTMAH-FF).

2.2.2.1. Copolímeros del ácido maleico y el metil vinil éter

Los copolímeros del ácido maleico y el metil vinil éter son una serie de copolímeros derivados del PMVEMA-AN (poli(metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico)). El PMVEMA-AC o poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) se obtiene mediante hidrólisis del PMVEMA-AN, y el PMVEMA-ES o poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico monoetil éster), mediante apertura en etanol [Fig. 2].

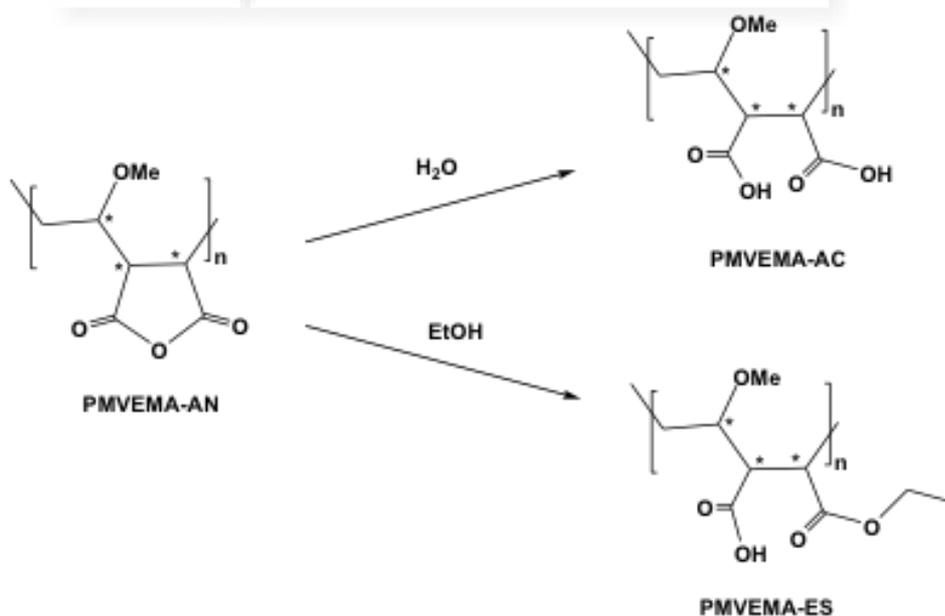


Figura 2. Copolímeros del ácido maleico y el etil metil éter: PMVEMA-AN, PMVEMA-AC y PMVEMA-ES.

Son polímeros biocompatibles con propiedades adhesivas y biodegradables, aptos para su uso como excipientes en formulaciones tópicas. Presentan, por tanto, unas características favorables para desarrollo de nanofibras poliméricas con aplicación como sistemas de liberación de fármacos para la vía tópica. Los derivados del PMVEMA difieren en su solubilidad, viscosidad y peso molecular, y por ello, en sus aplicaciones.

Con respecto a la solubilidad, el PMVEMA-AC es soluble en agua, mientras que el PMVEMA-ES es soluble en etanol (y parcialmente soluble en agua). El grado de homogeneidad con el que se incorporen a las nanofibras otros compuestos (como fármacos o coadyuvantes) y la forma en que queden distribuidos en ellas dependerá de su solubilidad en la disolución polimérica.

La viscosidad de los polímeros (menor en el PMVEMA-ES) influye en el diámetro y la morfología de las fibras obtenidas. La viscosidad de la disolución polimérica es un parámetro modificable ya que depende de la concentración de la disolución. Cuanto mayor sea la viscosidad, mayor será el diámetro de las fibras obtenidas, por lo que se debe ajustar este parámetro operacional hasta obtener fibras en la escala nanométrica. Sin embargo, si la viscosidad de la disolución es demasiado baja se pueden formar nanofibras con defectos o pueden aparecer gotas de polímero (*electrospray*). Por este motivo se deben optimizar las condiciones operacionales para cada polímero⁹.

Concretamente, se debe ajustar experimentalmente la concentración de la disolución polimérica, el flujo de bombeo, la distancia aguja-colector y el voltaje aplicado. Como antecedente, esta tarea fue realizada para el PMVEMA-AC en un Proyecto Fin de Carrera (PFC) recientemente finalizado en el laboratorio del Dr. Ricardo Mallavia Marín¹². Además, en dicho PFC se analizaron las nanofibras obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), presentando un diámetro de 55 ± 5 nm. Nanofibras elaboradas en las mismas condiciones pero incorporando el fármaco ácido 5-aminolevulínico presentaron

¹² Adrián Gómez Vicente. Desarrollo y optimización de nanofibras de PMVEMA-H mediante electrospinning [proyecto fin de carrera]. Elche: Escuela Politécnica Superior, Universidad Miguel Hernández; 2014.

una diámetro algo superior ($85\pm 10\text{nm}$). En ambos casos se encontraban en la escala nanométrica y la distribución de tamaños fue homogénea [Anexo 1].

Partiendo de los resultados obtenidos en el PFC, en este Trabajo Fin de Grado se continuó con el desarrollo de nanofibras de PMVEMA-AC para posteriormente adaptar las condiciones operacionales de *electrospinning* a otro copolímero, el PMVEMA-ES.

2.2.2.2. Bromuro de poli{{9,9-bis[6' (N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-2,7-fluoreno}-*alt*-1,4-fenilideno} (PTMAH-FF)

Los polifluorenos son polímeros π -conjugados de naturaleza orgánica, semiconductor y fluorescente. Entre sus propiedades electroópticas destaca la emisión de luz en el espectro visible.

El PTMAH-FF [Fig. 3] es un polifluoreno y polielectrolito conjugado de carácter catiónico¹³. Adicionado a una disolución polimérica puede modular la formación de nanofibras mediante *electrospinning* por el aporte de carga iónica adicional. Esto afectaría a la conductividad de la disolución polimérica, favoreciendo la formación y estabilización del *jet* y, como consecuencia, disminuyendo el diámetro de las nanofibras obtenidas¹⁴. Además, el PTMAH-FF queda incorporado a las nanofibras poliméricas, aportándoles fluorescencia y sirviendo como indicador de su morfología y de la homogeneidad con la que se distribuye en las nanofibras¹⁵.

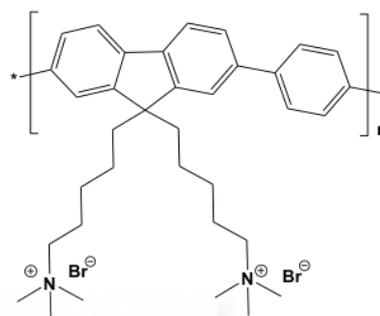


Figura 3. PTMAH-FF.

13 Mallavia R, Martínez-Pérez D, Chmelka BF, Bazan GC. Películas fluorescentes azules basadas en derivados de poli-2,7-fluorenofenilideno. Bol Soc Esp Ceram V. 2004;43(2):327-30.

14 Alhosseini SN, Moztafzadeh F, Mozafari M, Asgari S, Dodel M, Samadikuchaksaraei A, et al. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. Int J Nanomedicine. 2012;7:25-34.

15 Jalani G, Jung CW, Lee JS, Lim DW. Fabrication and characterization of anisotropic nanofiber scaffolds for advanced drug delivery systems. Int J Nanomedicine. 2014;9 Suppl 1:33-49.

2.3. ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO Y TERAPIA FOTODINÁMICA

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es el compuesto que inicia la vía de las porfirinas en la biosíntesis del grupo hemo, cofactor de la hemoglobina. La condensación de moléculas de ALA da lugar a una estructura tetrapirrólica, la protoporfirina IX (PpIX), que tiene la capacidad de ligar Fe^{2+} mediante enlaces de coordinación, formando el grupo hemo.

Como agente terapéutico, el ácido 5-aminolevulínico es un profármaco que *in vivo* se bioactiva a PpIX, un compuesto fluorescente y fotoactivo que se acumula en estructuras intracelulares, principalmente en las mitocondrias. Allí induce la formación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres y singletes de oxígeno) que producen daño celular mediante mecanismos oxidativos y finalmente la muerte por apoptosis de las células afectadas. La selectividad del ALA se basa en que se acumula y bioactiva más activamente las células hiperproliferativas, su diana terapéutica. Además, se administra localmente por vía tópica, directamente sobre las lesiones cutáneas.

La bioactivación del ALA a PpIX está favorecida por la exposición a luz visible y ultravioleta, y por ello se emplea como agente fotosensibilizador en la terapia fotodinámica (TFD). La TFD con ácido 5-aminolevulínico se emplea en la práctica clínica habitual en dermatología para el tratamiento de lesiones cutáneas como acné, queratosis actínica, carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas *in situ* (enfermedad de Bowen).

La eficacia antitumoral de la TFD con ALA está mediada, además de por la fototoxicidad, por sus propiedades antiangiogénicas, actuando sobre la neovascularización tumoral, y por la activación del sistema inmune, aumentando su respuesta antitumoral. Estos dos mecanismos de acción contribuyen a disminuir las recurrencias tumorales y la aparición de metástasis^{16,17}.

16 Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin. 2011;61(4):250-81.

17 Baldea I, Filip AG. Photodynamic therapy in melanoma--an update. J Physiol Pharmacol. 2012;63(2):109-18.

La terapia fotodinámica se lleva a cabo en dos pasos: en primer lugar se administra el fotosensibilizador, y a continuación se irradian las lesiones con la dosis de luz (J/cm^2) adecuada, normalmente mediante una fuente de luz roja de espectro estrecho (630nm) o más amplio y continuo (570-670nm). Además, para la administración tópica del ALA se requiere realizar un vendaje oclusivo de la zona de aplicación que se mantiene durante varias horas, generalmente tres. Transcurrido este tiempo, necesario para acumulación intracelular del fotosensibilizador, se lleva a cabo la irradiación lumínica.

El ácido 5-aminolevulínico y sus derivados (MET: aminolevulinato de metilo, HEX: hexaminolevulinato) también se pueden emplear para la señalización de células hiperproliferativas, lo que facilita el diagnóstico y proporciona orientación para el tratamiento. Esta técnica se basa en la detección de la fluorescencia de la PpIX acumulada intracelularmente en las lesiones. En España está autorizada para su uso en tumores cerebrales y cáncer de vejiga.

Grupo terapéutico	Medicamento	Fármaco	Indicaciones terapéuticas
Antineoplásicos: sensibilizantes utilizados en TFD	Ameluz® gel	ALA	Queratosis actínica
	Metvix® crema	MET	Queratosis actínica, carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas <i>in situ</i>
Agentes diagnósticos	Gliolan® solución oral	ALA	Visualización de tejidos malignos durante la cirugía del glioma maligno
	Hexvix® solución intravesical	HEX	Cistoscopia de fluorescencia con luz azul para el diagnóstico y manejo del cáncer de vejiga

Tabla 1. Medicamentos con ácido 5-aminolevulínico (ALA) y sus derivados (MET, HEX) comercializados en España.

El ALA, por su elevada hidrofilia, difunde con dificultad a través del estrato córneo de la piel y su absorción sistémica es casi nula. Gracias a esto apenas produce toxicidad sistémica, salvo una leve fotosensibilidad, y se puede emplear cómodamente sobre lesiones superficiales, como el acné o la queratosis actínica. Derivados más lipófilos como el MET pueden penetrar

mejor en la piel y por ello son utilizados en el tratamiento del carcinoma basocelular y carcinoma de células escamosas *in situ*.

La eficacia de la TFD con ALA en lesiones más infiltrantes como el melanoma se encuentra limitada por la baja biodisponibilidad intracelular del fotosensibilizador tras la administración tópica. Por este motivo se están desarrollando derivados del ALA con una mayor lipofilia (profármacos como ésteres o péptidos¹⁸) así como nuevas formas farmacéuticas (nanogeles o nanopartículas¹⁹) que mejoren su penetración cutánea.

Con respecto a las formulaciones tópicas de ALA, otra característica a evaluar es cómo se produce la liberación del principio activo desde la forma farmacéutica. En la TFD la administración del fotosensibilizador es sólo el primer paso y, a fin de aumentar la eficacia terapéutica, se requiere que la liberación del ALA sea rápida para que la mayor cantidad posible penetre en las lesiones cutáneas antes de que se lleve a cabo la irradiación con luz.

2.4. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

En este Trabajo Fin de Grado se realizaron ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz para estudiar la cinética de liberación del ALA formulado en nanofibras poliméricas de administración tópica. Para la comparación se utilizó como referencia una formulación semisólida convencional: la disolución polimérica viscosa con ALA a partir de la cual se elaboraron las nanofibras.

La metodología de elección para evaluar *in vitro* la cinética de liberación y/o absorción de formas farmacéuticas de administración tópica son los ensayos con celdas de Franz. Para la estandarización de estos estudios por vía tópica²⁰

18 Johnson RP, Chung CW, Jeong YI, Kang DH, Suh H, Kim I. Poly(L-histidine)-tagged 5-aminolevulinic acid prodrugs: new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX for photodynamic colon cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2497-512.

19 Shi L, Wang X, Zhao F, Luan H, Tu Q, Huang Z, et al. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2669-76.

20 Brown CK, Friedel HD, Barker AR, Buhse LF, Keitel S, Cecil TL, et al. FIP/AAPS joint workshop report: dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):782-94.

habitualmente se siguen las guías SUPAC-SS de la FDA²¹, en el caso de los ensayos de liberación *in vitro*, y el test 428 de la OECD²², para la permeabilidad *in vitro* o absorción transdérmica.

Para realizar los ensayos con celdas de Franz se puede escoger entre una amplia variedad de membranas sintéticas o piel. Las membranas sintéticas son las más indicadas para estudiar la cinética de liberación *in vitro* y para realizar los ensayos de calidad de las formulaciones tópicas. Presentan como ventajas su facilidad de manejo, bajo coste y mayor reproducibilidad.

Las celdas verticales de difusión o celdas de Franz estáticas [Fig. 4] constan de un compartimento donador, en el que se dispone la formulación, separado mediante una membrana del compartimento receptor, que contiene el medio de disolución y un brazo para la toma de muestras. Las celdas incorporan una cámara exterior por la que circula agua para mantener el medio receptor a 32°C, la temperatura de la piel humana. Además, disponen de agitación magnética en el compartimento receptor.

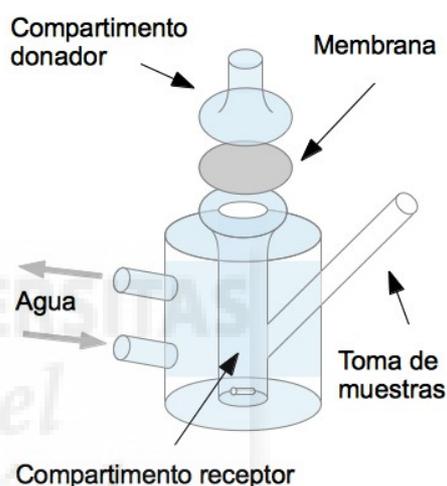


Figura 4. Celda de Franz estática con cámara exterior para termorregulación y barra magnética de agitación.

Durante un ensayo con celdas de Franz el compuesto en estudio se deposita en el compartimento donador, desde donde difunde a través de la membrana hasta el compartimento receptor. De acuerdo con el diseño del estudio se toman muestras del compartimento receptor a diferentes tiempos y se determina la concentración del compuesto mediante la técnica analítica escogida, en este TFG, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

21 FDA Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-Up and Post Approval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. 1997.

22 OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: In Vitro Method. 2004.

3. OBJETIVOS

El objetivo global de este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo de nanofibras poliméricas biocompatibles como sistema de liberación tópica del fármaco fotosensibilizador ácido 5-aminolevulínico (ALA) y el polielectrolito fluorescente PTMAH-FF para su posible aplicación en terapia fotodinámica.

Este objetivo global se puede describir en los siguientes objetivos específicos, que consisten en la preparación y caracterización de nanofibras poliméricas con ALA y PTMAH-FF (Objetivos 1-4) y el estudio preliminar de la cinética de liberación del ALA desde las nanofibras elaboradas (Objetivo 5).

1. Preparar mediante *electrospinning* nanofibras poliméricas de PMVEMA-AC y de PMVEMA-ES.
2. Preparar mediante *electrospinning* nanofibras poliméricas de PMVEMA-AC y de PMVEMA-ES que incorporen un 20% p/p del fármaco ALA y/o un 0,75% p/p del polielectrolito fluorescente PTMHA-FF.
3. Caracterizar todas las nanofibras obtenidas mediante microscopía óptica para estudiar el efecto de la adición del ALA y/o el PTMAH-FF sobre la morfología de las nanofibras.
4. Caracterizar las nanofibras que contienen PTMAH-FF mediante microscopía óptica de fluorescencia y espectroscopía de fluorescencia en estado sólido.
5. Evaluar la cinética de liberación del ALA en nanofibras poliméricas mediante ensayos de liberación con celdas de Franz y análisis por HPLC.
 - A. Elaborar una recta de calibrado para el ALA mediante HPLC.
 - B. Comparar la cinética de liberación desde las nanofibras poliméricas con una formulación de referencia (una disolución polimérica viscosa).
 - C. Estudiar las diferencias en la liberación de ALA entre las matrices poliméricas (nanofibras y disoluciones) de PMVEMA-AC y PMVEMA-ES.
 - D. Estudiar el efecto sobre la cinética de liberación del ALA de la adición de PTMAH-FF a las nanofibras poliméricas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS

Todos los reactivos y disolventes se emplearon directamente con la calidad suministrada por el fabricante (Sigma-Aldrich).

El fármaco ALA [Fig. 5] se adquirió en forma de hidrocloreto del ácido 5-aminolevulínico (pureza $\geq 97,0\%$, $M_w=167,59\text{g/mol}$, solubilidad (H_2O , 20°C) $>50\text{mg/mL}$, polvo blanco).

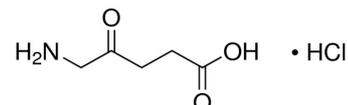


Figura 5. Ácido 5-aminolevulínico (ALA).

Los copolímeros empleados [Fig. 6] fueron: poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-AC, $M_w=1.980.000\text{g/mol}$, $M_n=960.000\text{g/mol}$, $\text{pH}\approx 2.5$ (5%, H_2O), polvo blanco) y poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-ES, $M_w=130.000\text{g/mol}$, $d=0,983\text{g/mL}$ (25°C), número ácido: 275-300mg KOH/g, solución 50% p/p en etanol).

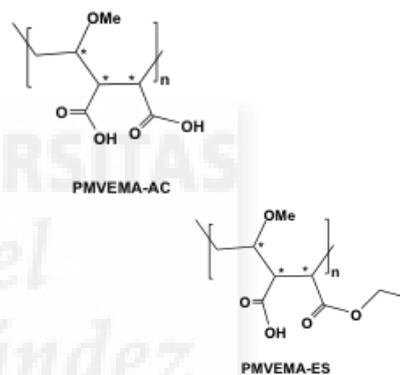


Figura 6. Copolímeros del ácido maleico y el etil vinil éster.

PTMAH-FF [Fig. 7] es el bromuro de poli{9,9-bis[6'(N,N,N-trimetilamonio) hexilo]-2,7-fluoreno}-*alt*-1,4-fenilideno}, un polielectrolito conjugado y polifluoreno sintetizado en el laboratorio del Dr. Ricardo Mallavia Marín¹³.



Figura 7. PTMAH-FF.

Los disolventes empleados fueron dimetilsulfóxido (DMSO, pureza $\geq 97\%$), etanol (pureza $\geq 99,8\%$) y agua (pureza Milli-Q®). El tampón fosfato ($\text{pH}=7$) para los ensayos con celdas de Franz se elaboró reciente a partir de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) y fosfato disódico (Na_2HPO_4) en disolución acuosa.

4.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS

Para obtener una disolución de PMVEMA-AC 20% p/p en agua se disolvieron 2g del producto comercial (PVMEMA-AC en polvo) en 8g de agua mediante agitación magnética a temperatura ambiente durante 60 minutos y se mantuvo en reposo durante 20 horas. Para una disolución de PMVEMA-ES 20, 25 ó 30% p/p en etanol se disolvieron 4, 5 ó 6g de la disolución comercial (PMVEMA-ES 50% p/p en etanol) en 6, 5 ó 4g de etanol, respectivamente, mediante agitación magnética a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Para preparar las disoluciones con PTMAH-FF se disolvieron 7,5mg de PTMAH-FF en la cantidad mínima de DMSO necesaria (38 μ L) y a continuación se adicionó 1g de agua. El PTMAH-FF disuelto en agua y DMSO se incorporó a 5g de la disolución de PMVEMA-AC 20% p/p o 4g de PMVEMA-ES 25% p/p mediante agitación magnética durante al menos 20 horas. Con la cantidad de PTMAH-FF añadido a la disolución polimérica se obtuvieron nanofibras con PTMAH-FF al 0,75% p/p.

Para elaborar las disoluciones poliméricas con ácido 5-aminolevulínico al 20% p/p respecto del polímero el ALA se incorporó mediante dos métodos:

- Método A. Se adicionaron 80mg de ALA directamente a 2g de la disolución de PMVEMA-AC mediante agitación magnética durante 30 minutos.
- Método B. Se preparó una disolución de ALA 1mg/mL en agua y se incorporó a la disolución polimérica (80mL al PMVEMA-AC 20% y 100mL al PMVEMA-ES 25%) mediante agitación magnética durante 2 horas.

Esta relación de fármaco/polímero (20% p/p) se seleccionó en base a la terapia convencional para el ácido 5-aminolevulínico: Levulan[®] solución 20% (comercializado en Estados Unidos) y Ameluz[®] gel 7,8% (comercializado en Europa). Se comprobó la capacidad de carga de las nanofibras incorporando el fármaco a la concentración más alta, 20% p/p. No obstante, la dosificación final depende no sólo de la concentración del fármaco en el vehículo, sino de la cantidad total aplicada sobre la piel en función de la extensión de las lesiones.

Para obtener las disoluciones con PTMAH-FF 0,75% p/p y ALA 20% p/p se procedió del mismo modo anteriormente descrito, tanto para el PMVEMA-AC como para el PMVEMA-ES. Es decir, en primer lugar se adicionó el polielectrolito fluorescente previamente disuelto en agua y DMSO y con agitación magnética durante al menos 20 horas. Y a continuación se adicionó el ALA mediante el método B: previa disolución en agua y con agitación magnética durante 2 horas.

4.3. PREPARACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Todas las nanofibras poliméricas se elaboraron mediante *electrospinning* en las mismas condiciones experimentales (voltaje aplicado: 15kV, distancia aguja-colector: 10cm y flujo de bombeo: 0,25mL/h), de acuerdo la optimización de dichos parámetros realizada previamente en el laboratorio del Dr. Ricardo Mallavia Marín. Se registraron las condiciones ambientales en que se realizó el *electrospinning*, manteniéndose la temperatura entre 20-25°C y la humedad ambiental entre el 35-50%.

La disolución polimérica se cargó en una jeringa Plastipak 2mL (Becton Dickinson) y se bombeó a través de una aguja de acero inoxidable 316, calibre 20 y longitud 10,16cm (Sigma-Aldrich) con un flujo (0,25mL/h) controlado por una bomba de infusión kdScientific 100. La aguja y el colector estuvieron a una distancia establecida (10cm) y conectados a una fuente de alta tensión Series FC (Glassman High Voltage, Inc), que aplica el voltaje responsable de la aparición del *jet* (15kV). La evaporación del disolvente a lo largo del *jet* origina la formación de las nanofibras, que se depositan sobre el colector [Fig. 1].

Se prepararon muestras de nanofibras sobre portaobjetos para su análisis mediante microscopía óptica y espectroscopía de fluorescencia, y se recogieron directamente sobre el colector para los ensayos con celdas de Franz.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

4.4.1. Microscopía óptica y de fluorescencia

Las imágenes de microscopía de las nanofibras se obtuvieron mediante un microscopio óptico de fluorescencia Microsystems DMI3000 B (Leica). Se obtuvieron imágenes de contraste de fases y de fluorescencia, así como la superposición de ambas para resaltar la localización de zonas fluorescentes.

4.4.2. Espectroscopía de fluorescencia

Se analizaron las nanofibras mediante un espectrofluorímetro en estado estacionario continuo QuantaMaster (Photon Technology International). Para poder analizar las nanofibras se empleó un soporte para muestras en estado sólido ajustado a 340° y 3,25mm [Anexo 2]. Se obtuvieron los espectros de fluorescencia de emisión (excitación a 370nm).

4.5. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

4.5.1. Procedimiento experimental

Los ensayos de liberación se realizaron con membranas de acetato de celulosa Cuprophan® (Medicell) y celdas de Franz (PermeGear®) con cámara exterior, orificio de 9mm ($0,64\text{cm}^2$) y un volumen receptor de 5mL. El sistema constó de seis celdas de Franz sobre un agitador magnético (IKA Laboratory Equipment) conectadas a un baño termostático (Selecta Digiterm-100) regulado a una temperatura de $32,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ [Fig. 8].

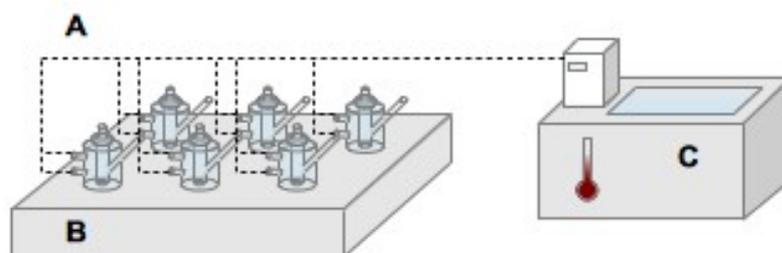


Figura 8. Instrumentación. A. Celdas de Franz. B. Agitador magnético. C. Baño termostático.

El pretratamiento de las membranas consistió en recortarlas al tamaño del orificio de la celda ($d=9\text{mm}$) y sumergirlas en el medio de disolución para homogeneizarlas. Las celdas se rellenaron de medio tampón fosfato ($\text{pH}=7$) y se termostató el sistema a $32,0\pm 0,5^\circ\text{C}$. Se colocaron las membranas previamente tratadas entre el compartimento donador y receptor, se cerró el sistema mediante una pinza metálica y se dejó estabilizar.

Para iniciar el ensayo, se colocaron las muestras de nanofibras con ALA en el compartimento donador. Se tomaron volúmenes conocidos del compartimento receptor (300 ó $450\mu\text{L}$) a diferentes tiempos según el diseño del ensayo (tiempo total: 180 ó 240 minutos) y se repuso con el mismo volumen de medio tampón fosfato nuevo. El muestreo altera la concentración de ALA en el compartimento receptor al retirar un volumen de medio con ALA y reponer con un volumen nuevo (sin ALA), lo que se corrigió posteriormente mediante el cálculo de las concentraciones corregidas de ALA.

Las muestras no requirieron tratamiento previo para su determinación. Se analizaron a medida que se extraían para evitar la degradación del ALA que se produce en medio acuoso a pH fisiológico y temperatura ambiente. El análisis se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Merck/Hitachi utilizando un detector detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) Alltech 3300 (Grace Davison Discovery Sciences). La columna utilizada fue LiChrospher® 100 P-18($5\mu\text{m}$) de Merck. Como fase móvil (isocrática) se empleó un 98% de agua con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v y un 2% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v, a un flujo de $1\text{mL}/\text{min}$ y una presión de 100bar .

Previamente se realizó mediante ELSD-HPLC una recta de calibrado de ácido 5-aminolevulínico en tampón fosfato ($\text{pH}=7$) entre las concentraciones 20 - $120\mu\text{g}/\text{mL}$ empleando la misma metodología que para el análisis de los ensayos de liberación. La ecuación obtenida se empleó en los ensayos de liberación *in vitro* para el cálculo de las concentraciones de ALA en los compartimentos receptores a partir del área integrada para el ALA en el HPLC.

4.5.2. Diseño de los ensayos

Se realizaron tres ensayos de liberación (1, 2 y 3) de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los ensayos se diferenciaron en las muestras empleadas: las disoluciones poliméricas con ALA (formulación de referencia) y las nanofibras con ALA elaboradas a partir de dichas disoluciones (formulación problema). Además, en el ensayo 3 se utilizaron muestras de nanofibras poliméricas que contenían el polielectrolito PTMAH-FF.

Antes de realizar los ensayos con celdas de Franz se confirmó que las nanofibras (y las disoluciones) contenían la cantidad de ALA teóricamente adicionada. Para ello, se realizaron diluciones de las disoluciones poliméricas originales (debido a su elevada viscosidad y concentración de ALA) y se trataron las nanofibras mediante agitación en *vórtex* en disolución acuosa para extraer el ALA. En ambos casos, la determinación mediante ELSD-HPLC confirmó la presencia de las cantidades establecidas de ALA.

En los ensayos 1 y 2 se estudió la cinética del liberación del ALA en dos matrices poliméricas diferentes: las disoluciones de PMVEMA-AC y las nanofibras de PMVEMA-AC. En el ensayo 1 se añadieron por triplicado 50 μ L de disolución de PMVEMA-AC con ALA 20% p/p (respecto al polímero), y en el ensayo 2 se añadieron por duplicado 9mg de nanofibras de PMVEMA-AC con ALA 20% p/p (respecto al polímero).

En el ensayo 3 se estudió la cinética del liberación del ALA en las dos matrices poliméricas: las nanofibras y las disoluciones de PMVEMA-ES. Además, se comparó la liberación del ALA desde las nanofibras de PMVEMA-ES que incorporaban PTMAH-FF con respecto a las que no. En este ensayo se adicionaron 5 μ L de disolución de PMVEMA-ES con ALA 20% p/p (respecto al polímero), 10 μ L de disolución de PMVEMA-ES con PTMAH-FF 0,75% p/p y ALA 20% p/p (respecto al polímero), 8mg de nanofibras de PMVEMA-ES con ALA 20% p/p (por duplicado) y 8mg nanofibras de PMVEMA-ES con PTMAH-FF 0,75% p/p y ALA 20% p/p (por duplicado).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Todas las nanofibras elaboradas según la técnica descrita en la Sección 4.3 se caracterizaron mediante microscopía óptica. Se compararon morfológicamente las nanofibras en función de la matriz polimérica empleada (PMVEMA-AC o PMVEMA-ES) y de la presencia o no de ácido 5-aminolevulínico (ALA). Esta caracterización permitió además detectar o descartar la presencia de defectos estructurales en las nanofibras.

Las nanofibras que contenían PTMAH-FF se caracterizaron adicionalmente mediante microscopía de fluorescencia y espectroscopía de fluorescencia. La caracterización de la fluorescencia de las nanofibras con PTMAH-FF refleja la forma en que el fluoróforo queda distribuido en las nanofibras, lo que permite identificar los parámetros que afectan a su incorporación en las nanofibras.

5.1.1. Microscopía óptica y de fluorescencia

Se prepararon nanofibras de PMVEMA-AC a partir de una disolución acuosa de PMVEMA-AC 20% p/p y se analizaron mediante microscopía óptica. Se observó que presentaban una morfología adecuada [Fig. 9]: nanofibras

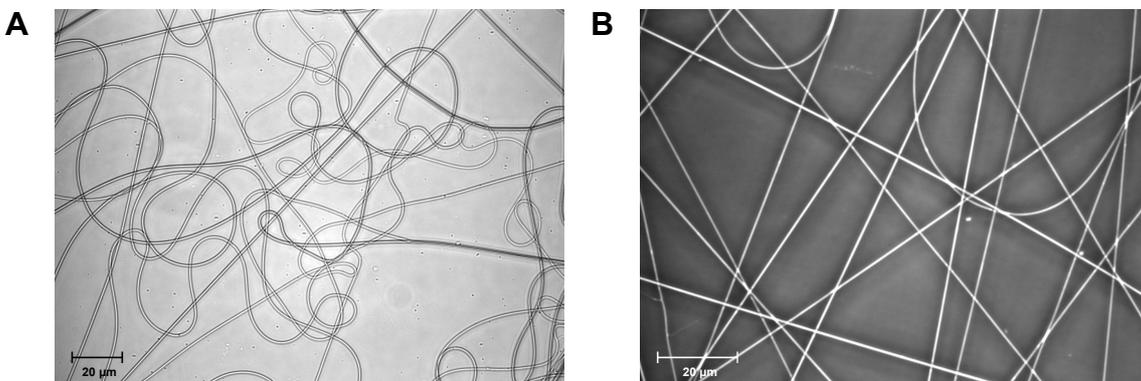


Figura 9. Nanofibras de PMVEMA-AC: imágenes de microscopía óptica a diferentes aumentos. (A) 400x. (B) 600x.

continuas, de tamaño uniforme y sin defectos.

Empleando las mismas condiciones de *electrospinning* se elaboraron nanofibras a partir de una disolución de PMVEMA-ES 20% p/p en etanol, obteniéndose una disolución de menor viscosidad que la de PMVEMA-AC 20% p/p. El resultado obtenido a partir de la disolución de PMVEMA-ES 25% p/p fueron nanofibras con imperfecciones con aspecto de “perlas en cadena” [Fig. 10A]. Por este motivo se incrementó la concentración de la disolución polimérica (30% p/p), lo que originó la formación de fibras de distintos grosores, algunas de ellas fuera de la escala nanométrica [Fig. 10B].

Finalmente, a una concentración intermedia (PMVEMA-ES 25% p/p en etanol) se demostraron resultado óptimos, obteniendo nanofibras sin irregularidades ni imperfecciones [Fig. 10C-D], al igual que en el caso de las nanofibras de PMVEMA-AC preparadas anteriormente.

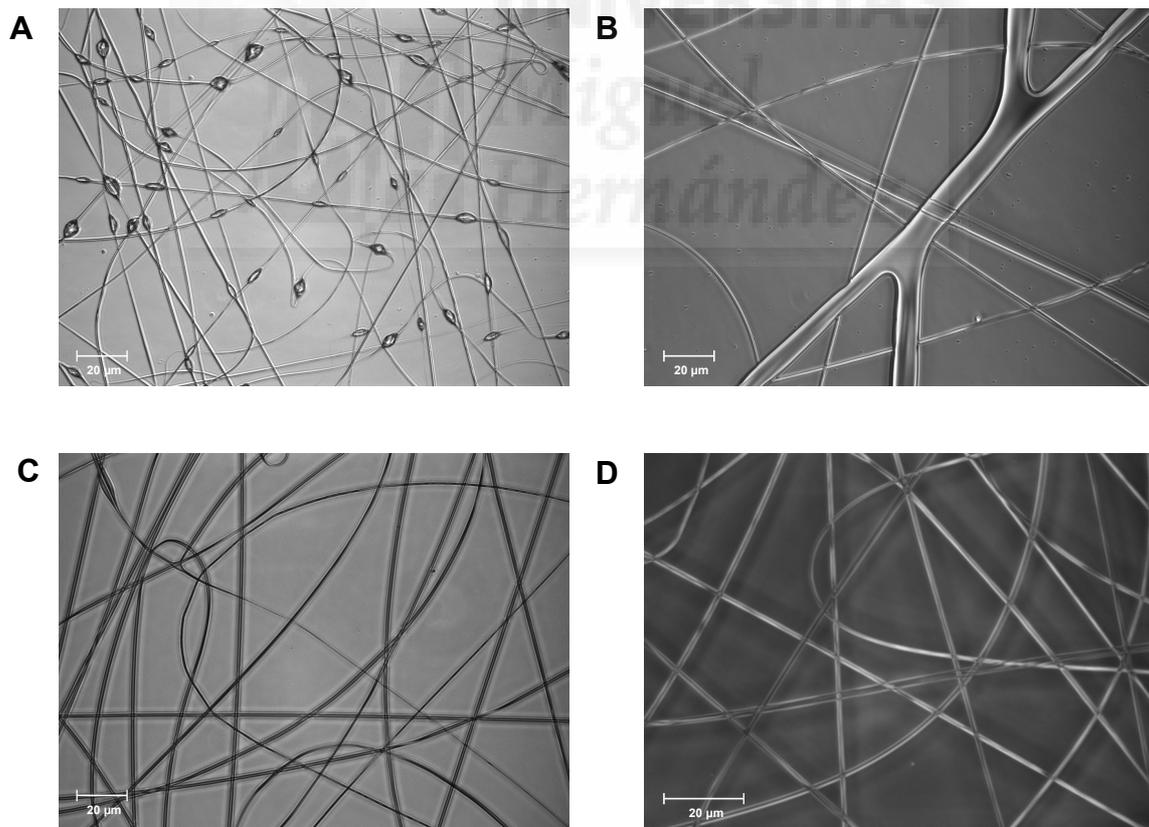


Figura 10. Nanofibras de PMVEMA-ES a partir de disoluciones con diferente concentración. (A) PMVEMA-ES 20% p/p. (B) PMVEMA-ES 30% p/p. (C y D) PMVEMA-ES 25% p/p.

Por tanto, a una misma concentración (20% p/p), la viscosidad del PMVEMA-ES en etanol fue menor que la del PMVEMA-AC en agua, y para obtener nanofibras sin defectos en las mismas condiciones de *electrospinning* se requirió aumentar la concentración del PMVEMA-ES hasta el 25% p/p.

La adición directa del ácido 5-aminolevulínico (ALA) en sólido a una disolución acuosa de PMVEMA-AC [Sección 4.2. Método A] generó nanofibras irregulares. Para corregir estas irregularidades, se adicionó el ALA en disolución acuosa y se aumentó el tiempo de agitación magnética [Sección 4.2. Método B]. De esta manera se obtuvo una disolución acuosa homogénea de ALA y PMVEMA-AC, y las nanofibras obtenidas a partir de dicha disolución presentaron una morfología correcta a la vez que incorporaban una elevada carga de fármaco (20% p/p) [Fig. 11A].

Del mismo modo [Método B], el ALA previamente disuelto en agua se incorporó a una disolución de PMVEMA-ES 25% p/p en etanol. En este caso las nanofibras mostraron unas leves imperfecciones [Fig. 11B], no presentes en las nanofibras anteriores de PMVEMA-AC. Esto se pudo deber a que el ALA se distribuyese más irregularmente en las nanofibras de PMVEMA-ES que en las de PMVEMA-AC, lo que se podría corregir mejorando la técnica de incorporación del fármaco a la disolución de PMVEMA-ES en etanol. Por ejemplo, disolviendo el ALA en etanol/agua para favorecer su solubilidad en el polímero en etanol.

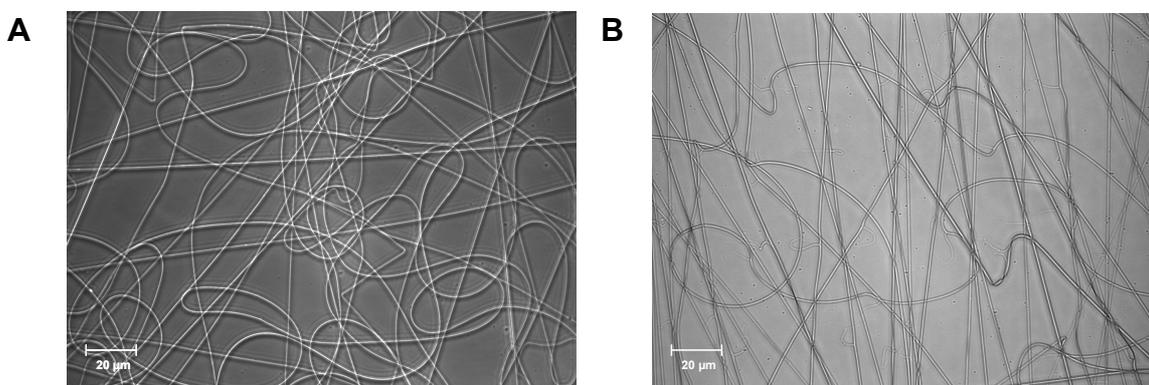


Figura 11. Nanofibras poliméricas con ALA 20% p/p. (A) PMVEMA-AC. (B) PMVEMA-ES.

La adición del polímero fluorescente PTMAH-FF a la disolución de PMVEMA-AC 20% p/p no supuso ningún cambio aparente en la morfología de las nanofibras. Sin embargo, mediante microscopía de fluorescencia se pudo observar que las nanofibras presentaban una fluorescencia heterogénea [Fig. 12A] cuando el PTMAH-FF no se había distribuido uniformemente en la disolución polimérica, lo que se evidenciaba por la presencia de agregados insolubles. Para su correcta incorporación se requirió la disolución previa del PTMAH-FF en DMSO y agua, así como agitación magnética en el PMVEMA-AC durante al menos 20 horas. Este método permite obtener nanofibras con fluorescencia mucho más homogénea, aunque con pequeñas irregularidades [Fig. 12B] que podrían minimizarse optimizando aún más los parámetros de incorporación del PTMAH-FF (tiempo de agitación y disolución previa).

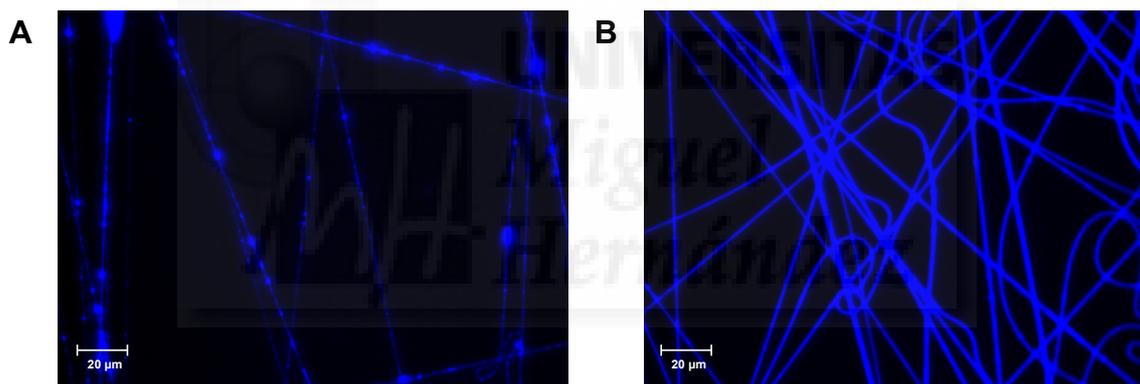


Figura 12. Nanofibras de PMVEMA con PTMAH-FF 0,75% p/p. (A) PTMAH-FF mal distribuido en las nanofibras. (B) PTMAH-FF distribuido adecuadamente en las nanofibras.

Sin embargo, la adición del PTMAH-FF (previa disolución en DMSO y agua) a la disolución de PMVEMA-ES 25% p/p en etanol resultó en una incorporación más fácil y homogénea del PTMAH-FF que en el caso de la disolución de PMVEMA-AC en agua. Esto se puede deber a una mayor solubilidad del polielectrolito conjugado en etanol que en agua. Asimismo, en la microscopía de fluorescencia se observó que las nanofibras obtenidas presentaban una fluorescencia más homogénea y sin irregularidades [Fig. 13].

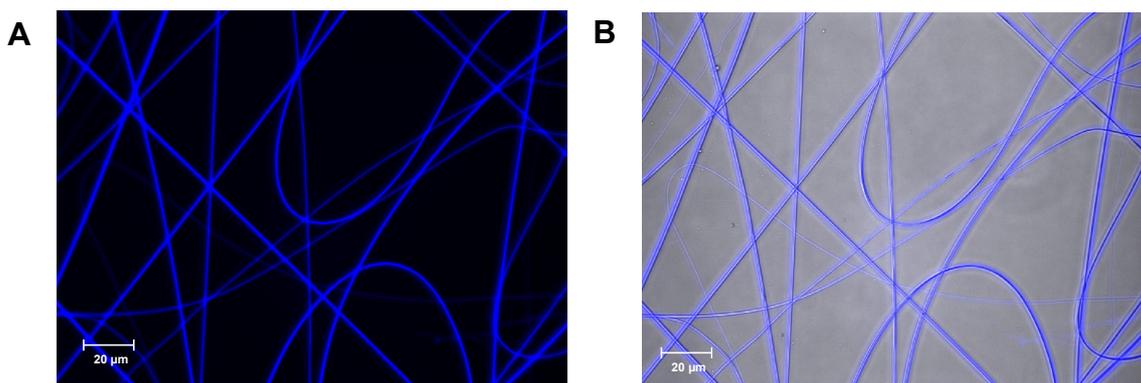


Figura 13. Nanofibras de PVMVEMA-ES con PTMAH-FF 0,75% p/p. (A) Microscopía óptica de fluorescencia. (B) Superposición de microscopía óptica de contraste de fases y fluorescencia.

Para incorporar tanto el PTMAH-FF como el ALA a una misma disolución polimérica se empleó la técnica previamente descrita: en primer lugar el PTMAH-FF previamente disuelto en DMSO y agua y con agitación magnética durante al menos 20 horas y a continuación el ALA en disolución acuosa [Método B]. De este modo se obtuvieron nanofibras poliméricas con un 0,75% p/p de PTMAH-FF y un 20% p/p de ALA, tanto de PMVEMA-AC [Fig. 14A] como de PMVEMA-ES [Fig. 14B].

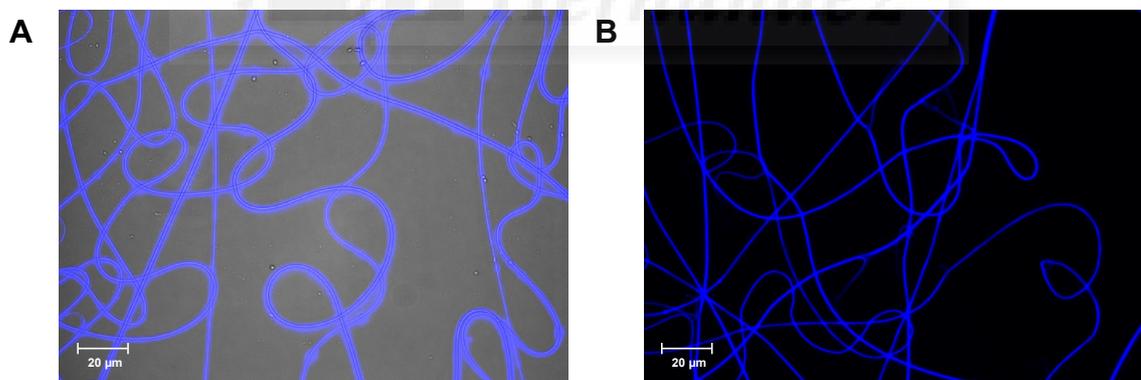


Figura 14. Nanofibras con PTMAH-FF 0,75% p/p y ALA 20% p/p. (A) PMVEMA. Imagen de fluorescencia sobre contraste de fase. (B) PMVEMA-ES. Imagen de fluorescencia.

La morfología de las nanofibras con PTMAH-FF y ALA fue idéntica a las que contenían únicamente ALA. Del mismo modo, la fluorescencia de las nanofibras con ALA es equiparable a las nanofibras sin ALA. Por tanto, la

incorporación del PTMAH-FF no afectó a la incorporación del ALA y viceversa. En cambio, el grado de homogeneidad en la incorporación del ALA y el PTMAH-FF sí dependió de la matriz polimérica empleada, el PMVEMA-AC o el PMVEMA-ES.

En resumen, en la incorporación mediante mezcla el factor más importante para obtener nanofibras cargadas uniformemente es la correcta distribución y homogeneización del compuesto adicionado (fármaco y/o polielectrolito fluorescente) en la disolución polimérica antes del proceso de *electrospinning*.

Estas condiciones de incorporación se pueden optimizar, en primer lugar, añadiendo el compuesto previamente disuelto en el mismo disolvente que la disolución polimérica (agua/agua), o mediante un codisolvente miscible (agua/etanol). En segundo lugar, el tiempo de agitación se debe prolongar las horas necesarias para permitir la mezcla completa del compuesto añadido a la disolución polimérica viscosa. El aspecto macroscópico de la disolución polimérica (sin presencia de agregados ni separación de fases) es el primer indicador del estado de la disolución y del grado de homogeneidad con el que el compuesto se distribuye en la disolución polimérica.

Se observaron diferencias en la incorporación del ALA y del PTMAH-FF entre las dos matrices poliméricas empleadas, las nanofibras de PMVEMA-AC y de PMVEMA-ES. En el caso del PMVEMA-AC (disolución acuosa), está más favorecida la incorporación del ALA (hidrosoluble), obteniéndose nanofibras sin alteraciones morfológicas. En cambio, el polielectrolito conjugado PTMAH-FF se incorpora con más facilidad al PMVEMA-ES (en etanol) y genera nanofibras con una fluorescencia más uniforme.

5.1.2. Espectroscopía de fluorescencia

Se estudiaron las propiedades ópticas de las nanofibras con PTMAH-FF mediante espectroscopía de fluorescencia en estado sólido. En primer lugar se comprobó que no había emisión por parte de las nanofibras poliméricas que no contenían PTMAH-FF, de manera que los espectros de fluorescencia registrados se debieron a la presencia del polímero fluorescente PTMAH-FF.

A continuación se analizaron las nanofibras con PTMAH-FF tanto de PMVEMA-AC como de PMVEMA-ES y se obtuvieron espectros de fluorescencia en estado sólido bien definidos [Fig. 15]. Las nanofibras de PMVEMA-AC presentaron una banda de emisión máxima a 407nm y otra banda neta a 443nm. Por otro lado, las nanofibras de PMVEMA-ES presentaron una banda de emisión máxima a 421nm, y un hombro entorno a 425-30nm.

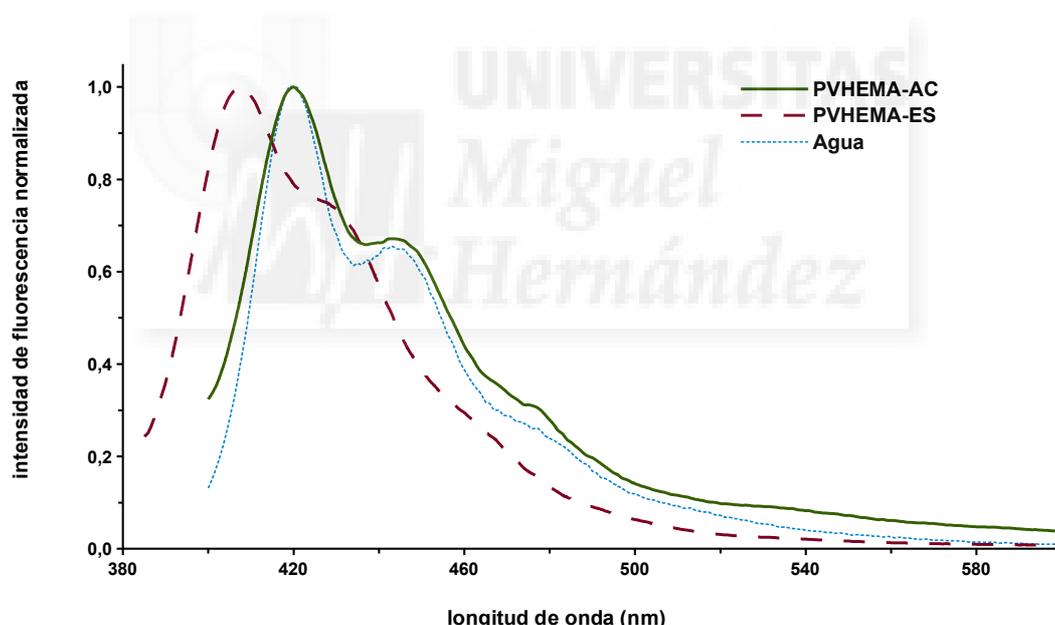


Figura 15. Espectroscopía de fluorescencia del PTMAH-FF en nanofibras de PMVEMA-AC, en nanofibras de PMVEMA-ES y en disolución acuosa.

Al incorporar el PTMAH-FF en nanofibras de PMVEMA-AC el espectro en estado sólido se asemejó al del PTMAH-FF en disolución acuosa. En cambio, en las nanofibras de PMVEMA-ES el espectro de fluorescencia apareció desplazado hacia longitudes de onda menores (efecto hipsocrómico), como

sucede cuando el PTMAH-FF se incorpora en estructuras ordenadas como películas de sílice mesoporosa¹³. Esto puede deberse a una conformación más extendida del PTMAH-FF en las nanofibras de PMVEMA-ES con respecto al PMVEMA-AC, lo que coincide con las observaciones realizadas mediante microscopía de fluorescencia, donde se apreció que el PTMAH-FF se incorporaba más fácilmente y presentaba mayor homogeneidad en las nanofibras de PMEVMA-ES [Fig. 13].

Por tanto, el espectro de emisión del PTMAH-FF varía en función de la matriz polimérica en la que se encuentre, y dependería principalmente de la disposición conformacional del PTMAH-FF en las nanofibras poliméricas.

Por otro lado, la incorporación del ácido 5-aminolevulínico a las nanofibras de PMVEMA-AC [Fig. 16] no perturbó significativamente las propiedades ópticas del fluoróforo. Se observó una leve diferencia entre la resolución de la banda entorno a 443nm, posiblemente debida a cambios en la homogeneidad de las nanofibras poliméricas al incorporar ALA. Como se ha observado en experiencias previas (PFC), el diámetro de las fibras con ALA es mayor¹² y es habitual que se alteren ligeramente las propiedades de las nanofibras cargadas con fármacos, lo que evidencia que el fármaco se ha incorporado.

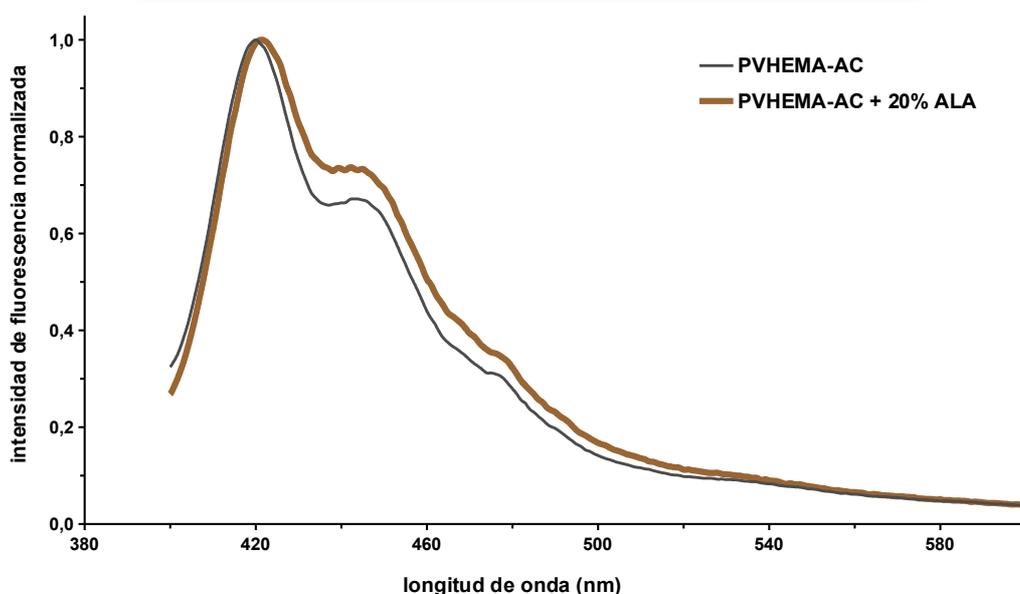


Figura 16. Espectroscopía de fluorescencia del PTMAH-FF en nanofibras de PMVEMA-AC y en nanofibras de PMVEMA-AC con ácido aminolevulínico 20% p/p.

5.2. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Se realizaron ensayos de liberación *in vitro* con celdas de Franz para comparar la cinética de liberación del ácido 5-aminolevulínico en las nanofibras con respecto a las disoluciones poliméricas, así como estudiar las diferencias entre las matrices de PMVEMA-AC y PMVEMA-ES. Por último, se estudió el efecto de la adición de PTMAH-FF a las nanofibras de PVMEMA-ES.

5.2.1. Recta de calibrado del ácido 5-aminolevulínico

Se realizó una regresión lineal sobre las áreas de integración obtenidas mediante ELSD-HPLC frente a las concentraciones patrón analizadas de ALA en tampón fosfato (pH=7). Las concentraciones empleadas fueron las habituales para los ensayos de liberación *in vitro* realizados, entre 20-120 µg/mL [Anexo 3]. Se obtuvo la ecuación de la recta $y=13,28x-269,35$ ($R^2=0,9914$), que se empleó en el tratamiento de datos. Asimismo, se comprobó que sólo es posible obtener mejores correlaciones con el ajuste cuadrático o cúbico ($R^2=0,9999$), lo que coincide con ajustes previos realizados por otros autores²³.

5.2.2. Cinética de liberación

Mediante los datos de las concentraciones de ALA en los compartimentos receptores obtenidos a través del HPLC se calculó la cantidad acumulativa de ALA liberada en función del tiempo. Se representó como el porcentaje de ALA liberado frente al tiempo, tomando como referencia (100% liberado) la cantidad teórica de ALA inicialmente adicionada en el compartimento donador. En todos los ensayos con muestras realizadas por duplicado y triplicado se obtuvieron las medias y la desviación estándar, que se representan como barras de error.

23 Armoškaitė V, Jakštas V, Ivanauskas L, Ražukas A, Ramanauskienė K, Briedis V. Application of HPLC-ELSD for the Quantification of 5- Aminolevulinic Acid after Penetration into Human Skin Ex Vivo. Analytical Letters. 2013;46(5):717-33.

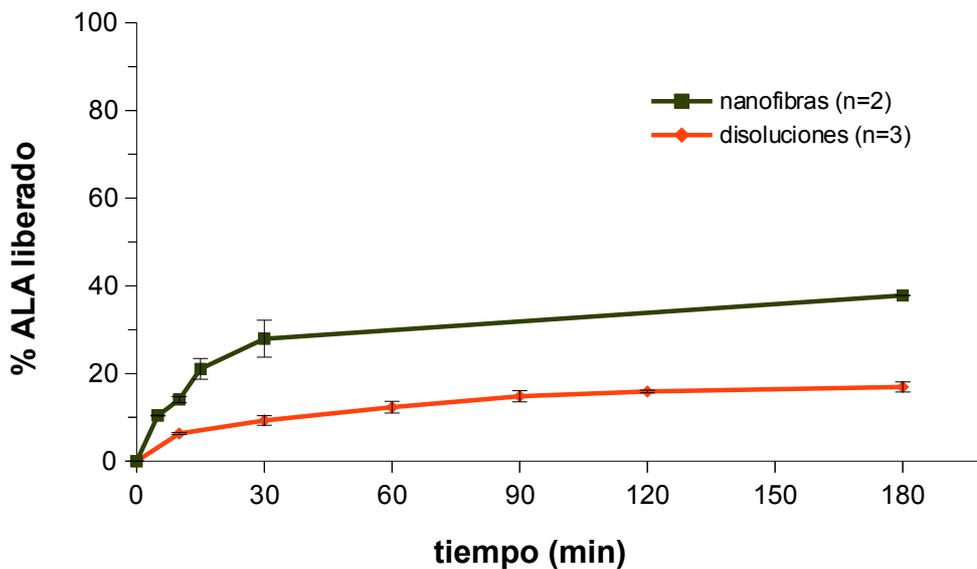


Figura 17. Cinética de liberación del ALA en diferentes formulaciones poliméricas de PMVEMA-AC [Ensayos 1 y 2].

En las disoluciones poliméricas de PMVEMA-AC ensayadas la liberación final del ALA (a las 3 horas) es menor del 20%. Gran parte del ALA no difunde a través de la membrana porque permanece en el compartimento receptor, retenido en la disolución polimérica acuosa, de una elevada viscosidad y alta afinidad por compuestos hidrófilos como el ALA.

En las nanofibras de PMVEMA-AC se produce una liberación inicial del 30% en la primera hora, y sólo de un 10% más en las dos horas siguientes. Como se observó mediante microscopía óptica, el ALA se incorpora homogéneamente a las nanofibras de PMVEMA-AC [Fig. 11A], lo que favorece un perfil cinético estable, con una liberación a un ritmo lento y sostenido. De acuerdo a esta cinética de liberación, las nanofibras de PMVEMA-AC podrían ser unas buenas candidatas para desarrollar sistemas de liberación sostenida de fármacos hidrófilos como el ácido 5-aminolevulínico. Esto se debería confirmar mediante ensayos de liberación de 24 o 48h de duración, teniendo en cuenta como posible factor limitante la estabilidad del ALA en disolución acuosa.

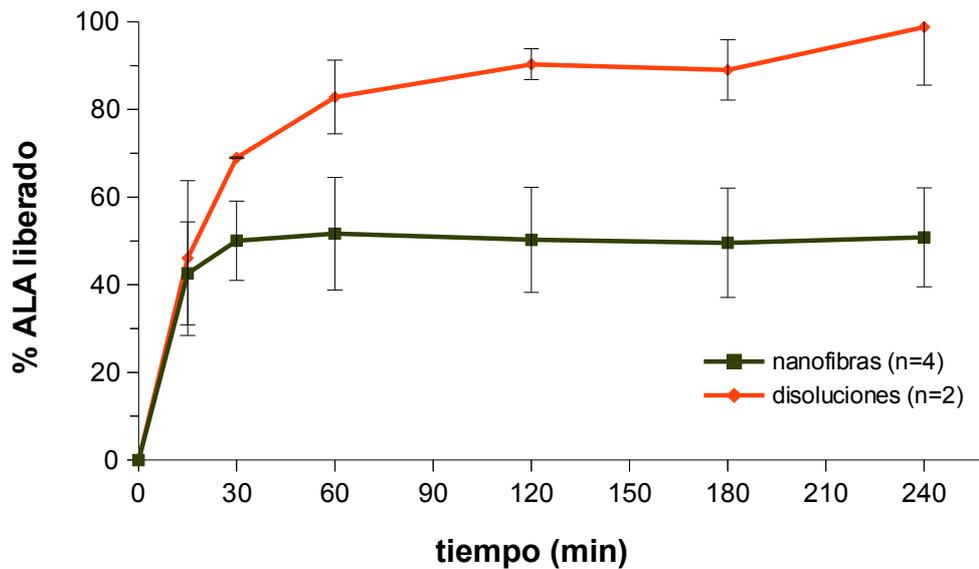


Figura 18. Cinética de liberación del ALA en diferentes formulaciones poliméricas de PMVEMA-ES [Ensayo 3].

A diferencia del PMVEMA-AC, en las disoluciones de PMVEMA-ES la liberación del ALA es casi total a las 4 horas ($\approx 100\%$). Inicialmente (en la primera hora) se libera casi el 80%. La matriz polimérica de PMVEMA-ES en etanol presenta menor viscosidad y afinidad por el ALA, por lo que la liberación es más rápida y la cantidad total liberada es igualmente superior.

Asimismo, en las nanofibras de PMVEMA-ES la liberación total es de un 50%, y también se produce prácticamente toda de manera inmediata (en la primera hora). El 50% restante del ALA permanece unido a las nanofibras del PMVEMA-ES y no difunde. Una parte del ALA difunde rápidamente ya que presenta mayor afinidad por el medio acuoso de las celdas que por la matriz de PMVEMA-ES, mientras que la otra parte no difunde y permanece retenida en las nanofibras. Esta variación en la cinética de liberación con respecto al PMVEMA-AC se puede deber a diferencias en la homogeneidad en la incorporación del ALA a las nanofibras, como se observó mediante microscopía óptica [Fig. 11].

La cinética de liberación rápida que presentan las nanofibras de PMVEMA-ES

con ALA es más apropiada para la terapia fotodinámica, donde se busca una liberación inmediata del fotosensibilizador tras la administración tópica. Las nanofibras poliméricas, gracias a su elevada relación superficie/volumen, presentan una gran superficie disponible para la liberación, haciendo posibles cinéticas de liberación muy rápidas.

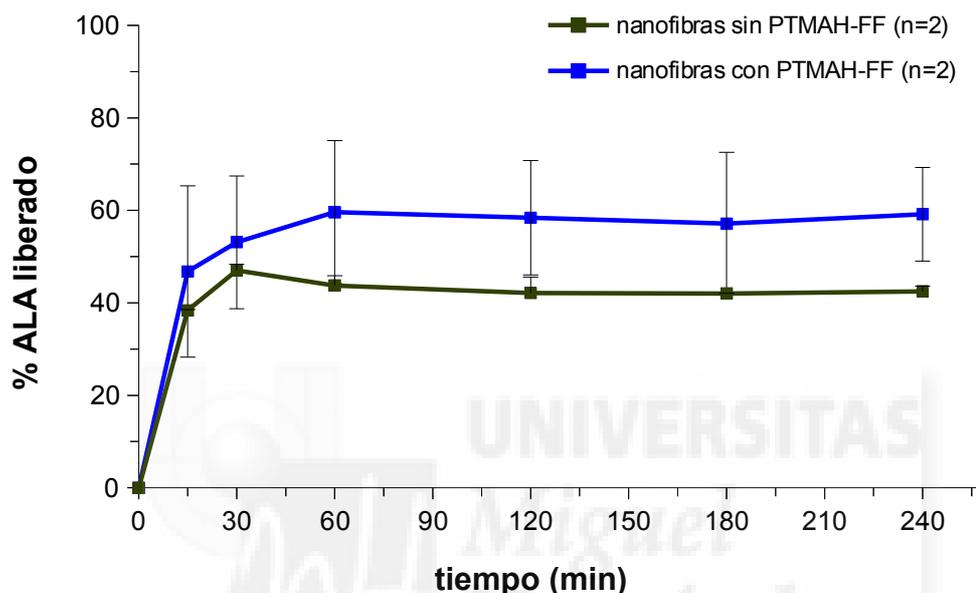


Figura 19. Cinética de liberación del ALA en nanofibras de PMVEMA-ES con el polielectrolito conjugado PTMAH-FF y sin él [Ensayo 3].

La adición de PTMAH-FF a las nanofibras de PMVEMA-ES parece afectar a la cinética de liberación del ALA, aumentándola [Fig. 19]. Debido al escaso número de muestras empleadas para este ensayo la desviación estándar es elevada y los resultados se deberían confirmar en ensayos posteriores.

La mayor liberación podría explicarse en que las fibras con PTMAH-FF presenten diferentes características morfológicas, como un menor diámetro y, por tanto, una mayor superficie para la liberación. Estas posibles diferencias de tamaño entre las nanofibras con y sin PTMAH-FF se podrían caracterizar definitivamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

6. CONCLUSIONES

Se han preparado disoluciones poliméricas de PMVEMA-AC 20% y PMVEMA-ES 25%, aptas para la elaboración de nanofibras mediante *electrospinning*. La disolución de PMVEMA-ES fue menos viscosa, por lo que requirió una concentración mayor que el PMVEMA-AC para producir nanofibras sin defectos. En ambos casos se han obtenido nanofibras poliméricas con una morfología adecuada, confirmado mediante microscopía óptica.

Además, se incorporó homogéneamente un polielectrolito conjugado, el polifluoreno PTMAH-FF al 0,75% p/p, lo que se ha caracterizado a través de microscopía de fluorescencia y espectroscopía de fluorescencia. Estos resultados sugirieron que la incorporación ordenada del PTMAH-FF al polímero de las nanofibras está más favorecida en el caso del PMVEMA-ES.

Las nanofibras preparadas también han sido capaces de incorporar un 20% p/p del fármaco ácido 5-aminolevulínico sin perturbar su morfología, con posible aplicación en la administración tópica para el tratamiento de patologías dermatológicas mediante terapia fotodinámica.

La liberación *in vitro* del ALA formulado en nanofibras se ha estudiado mediante ensayos con celdas de Franz, que mostraron como la matriz polimérica empleada afecta a la cinética de liberación de ALA. En el caso del PMVEMA-AC, se han observado características favorables como sistema de liberación sostenida. En cambio, el PVMEMA-ES se ha adaptado mejor a las características farmacocinéticas de interés en la terapia fotodinámica, esto es, la liberación inmediata del fotosensibilizador (ALA).

Por último, se ha observado que la incorporación del PTMAH-FF a las nanofibras poliméricas de PMVEMA-ES podría favorecer una liberación mayor y más rápida del fármaco, aunque debería ser confirmado mediante ensayos adicionales de liberación *in vitro*.

7. ANEXOS

ANEXO 1. ANTECEDENTES: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE NANOFIBRAS DE PMVEMA-AC

Imágenes de microscopía electrónica de nanofibras de PMVEMA-AC [Fig. 20A-B] y nanofibras de PMVEMA-AC con ácido 5-aminolevulínico 20% p/p [Fig. 20C-D] obtenidas para el Proyecto Fin de Carrera de Adrián Gómez Vicente (EPSE-UMH, 2014)¹².

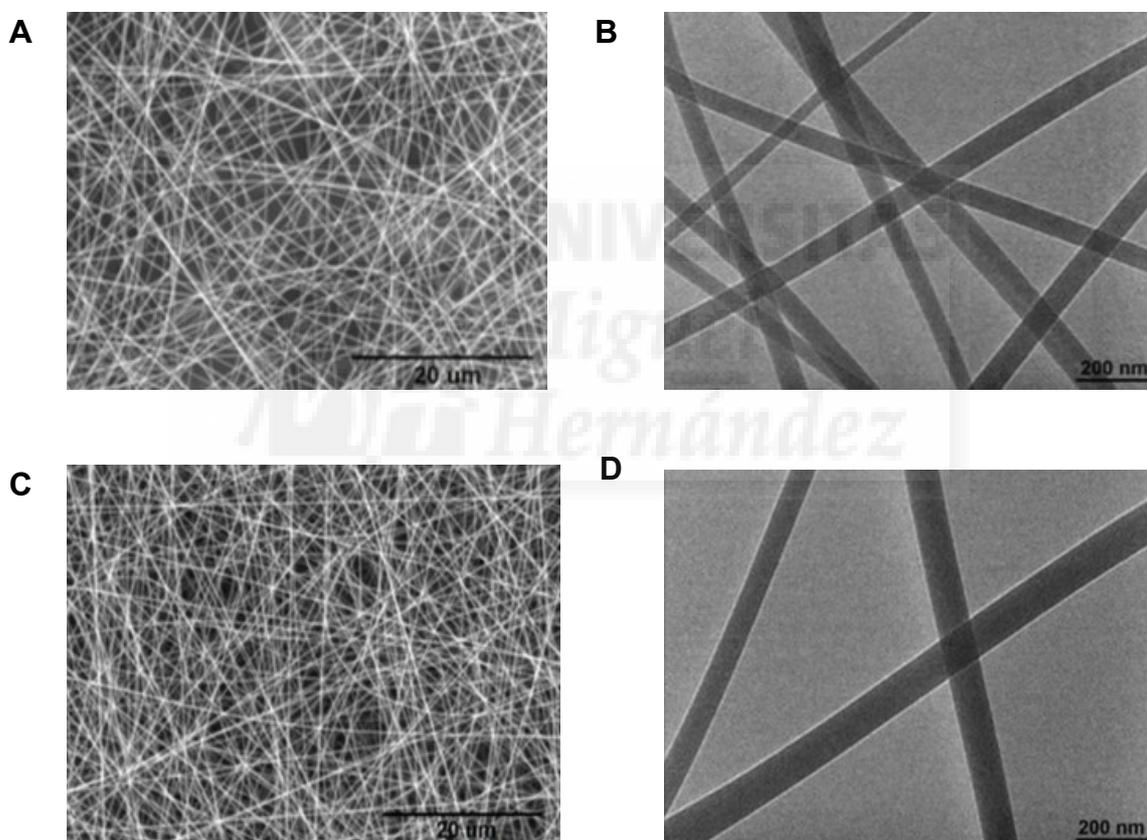


Figura 20. (A y C) Microscopía electrónica de barrido (SEM). (B y D) Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

ANEXO 2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN ESTADO SÓLIDO

El espectrofluorímetro de fluorescencia QuantaMaster (PTI) dispone de un soporte adaptado para muestras en estado sólido, permitiendo así el estudio de fluorescencia de las nanofibras. Para su análisis, se elaboraron nanofibras poliméricas mediante *electrospinning* y se recogieron directamente sobre un portaobjetos de vidrio. Éste se colocó en la peana giratoria [Fig. 21], inmovilizándolo mediante dos abrazaderas metálicas reguladas por sendos tornillos con rosca.



Figura 21. Soporte para muestras en estado sólido (peana giratoria).

Es posible regular dos parámetros del soporte: el ángulo de incidencia de la luz sobre la muestra (el soporte es giratorio) y la distancia con la muestra (mediante un tornillo micrométrico). Se pueden optimizar estos parámetros hasta obtener un valor óptimo, que se corresponde con el máximo de emisión de fluorescencia de las nanofibras. Para las muestras analizadas en este TFG, se obtuvieron los mayores recuentos de fluorescencia a 340° y 3,25mm, por lo que la espectroscopía de fluorescencia de las nanofibras que contenían PTMAH-FF se realizó en esas condiciones.

ANEXO 3. RECTA DE CALIBRADO DE ALA MEDIANTE ELSD-HPLC

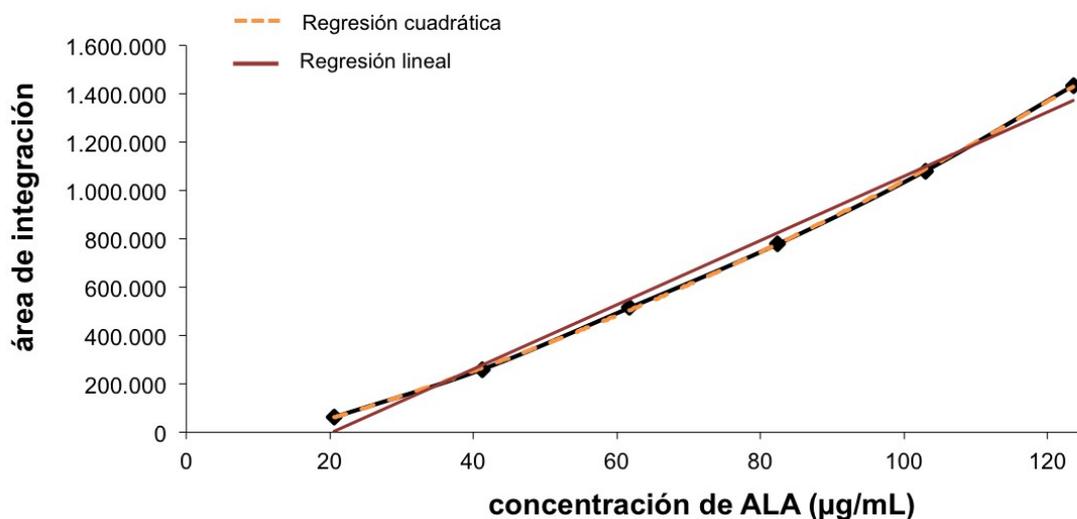


Figura 22. Recta de calibrado de ácido 5-aminolevulínico en tampón fosfato (pH=7). Regresión lineal: $y = 13,28x - 269,35$ ($R^2 = 0,9914$). Regresión cuadrática: $y = 40,71x^2 + 7.410,80x - 108,072$ ($R^2 = 0,9999$).

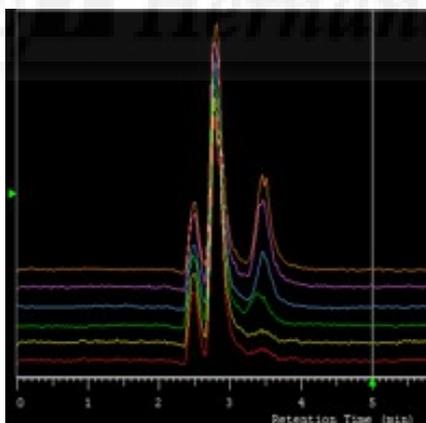


Figura 23. Cromatograma de la recta de calibrado de ácido 5-aminolevulínico en tampón fosfato (pH=7). Tiempo de retención: ALA = 3,5min, tampón fosfato = 2,5-3min.