



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica
Área de Química Inorgánica**

**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
Curso 2020-2021**

Trabajo Fin de Máster

María Hernández Marín

Desarrollo de nanofibras poliméricas con retinoides para el tratamiento de la hidradenitis supurativa

Tutores:

Ricardo Mallavia Marín

Amalia Mira Carrió

D. Ricardo Mallavia Marín, Profesor de Química inorgánica del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo que lleva por título “Desarrollo de nanofibras poliméricas con retinoides para el tratamiento de la hidradenitis supurativa”, presentado por María Hernández Marín, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología sanitaria de Elche en la Universidad Miguel Hernández.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado.

RESUMEN

La hidradenitis supurativa, es una afección inflamatoria crónica caracterizada por la aparición de lesiones dolorosas, nódulos y abscesos en la piel. La administración oral de algunos retinoides, como la acitretina y la isotretinoína, se utilizan para tratar esta enfermedad, sin embargo, pueden generar efectos secundarios en el organismo. Por tanto, para lograr manejar esta enfermedad sin originar esos efectos adversos en los pacientes, en este trabajo se ha llevado a cabo un tratamiento alternativo mediante la encapsulación de estos retinoides por separado en diferentes tipos de nanofibras poliméricas, para una posterior administración transdérmica en las zonas de la piel afectadas. Estas nanofibras se sintetizaron empleando la técnica de electrohilatura, a partir de diferentes disoluciones poliméricas realizadas con los polímeros PMVEMA-ES y PMVEMA-Ac, los cuales son biocompatibles y biodegradables. Las nanofibras se caracterizaron mediante microscopía óptica y electrónica, y se estudió la estabilidad los compuestos encapsulados en las diferentes fibras a lo largo del tiempo. También se realizaron ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz, así como de viabilidad celular en una línea de queratinocitos (HaCaT).

Palabras clave:

Acitretina - Celdas de Franz - *Electrospinning* - Hidradenitis supurativa - Isotretinoína - Nanofibras

ABSTRACT

Hidradenitis suppurativa is a chronic inflammatory condition characterised by painful lesions, nodules and abscesses on the skin. Oral administration of some retinoids, such as acitretin and isotretinoin, are used to treat this disease, however, they can cause side effects in the body. Therefore, in order to manage this disease without causing these adverse effects in patients, in this work an alternative treatment has been carried out by encapsulating these retinoids separately in different types of polymeric nanofibres, for subsequent transdermal administration in the affected areas of the skin. These nanofibres were synthesised using the electrospinning technique, from different polymeric solutions made with the polymers PMVEMA-ES and PMVEMA-Ac, which are biocompatible and biodegradable. The nanofibres were characterised by optical and electron microscopy, and the stability of the compounds encapsulated in the different fibres was studied over time. In vitro release assays were also performed using Franz cells, as well as cell viability in a keratinocyte line (HaCaT).

Keywords:

Acitretin – Franz Cells - *Electrospinning* - Hidradenitis suppurativa - Isotretinoin - Nanofibers

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. <i>ELECTROSPINNING</i> Y NANOFIBRAS.....	5
1.3. RETINOIDES.....	7
1.4. POLÍMERO.....	12
2. OBJETIVOS	14
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	15
3.1. MATERIALES.....	15
3.2. INSTRUMENTACIÓN.....	16
3.3. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS.....	19
3.4. VISCOSIDAD DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS.....	21
3.5. PREPARACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS.....	22
3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS.....	22
3.7. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO.....	23
3.8. ENSAYOS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> MEDIANTE CELDAS DE FRANZ.....	24
3.9. ENSAYOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	25
4. RESULTADOS	26
4.1. VISCOSIDAD DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS.....	26
4.2. PREPARACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS.....	26
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS.....	27
4.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO.....	34
4.5. ENSAYOS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> MEDIANTE CELDAS DE FRANZ.....	38
4.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	39
5. DISCUSIÓN	41
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46

1. INTRODUCCIÓN

La hidradenitis supurativa (HS), también conocida como acné inverso, es una afección inflamatoria crónica, debilitante y recurrente de la piel caracterizada por unas lesiones dolorosas o supurantes recurrentes, que suelen aparecer en regiones donde se encuentran las glándulas sudoríparas apocrinas. Los pacientes que padecen esta enfermedad desarrollan nódulos inflamados y dolorosos, abscesos y tractos sinusales en los pliegues de la piel de las axilas, los glúteos, las zonas perineales y las zonas intertriginosas [1][2].

La HS es una enfermedad que aparece normalmente en la edad adulta, en la pubertad y antes de los 40 años, afectando a ambos sexos por igual. Se ha observado en diferentes estudios que la prevalencia de esta enfermedad en Europa es del 1 % al 4 % [1][3].

1.1. ANTECEDENTES

La patogénesis de la HS a día de hoy está en estudio y continúa sin estar lo suficientemente clara, aunque todo parece indicar que es multifactorial. Este trastorno crónico de la piel podría estar causado por factores ambientales, endocrinos, genéticos y microbiológicos. Los estudios de Prens *et al.* [4] apuntan a que el principal acontecimiento en el desarrollo de esta enfermedad es la oclusión folicular, provocada probablemente por la queratosis infundibular y la hiperplasia del epitelio folicular. Este suceso conduce a la acumulación de restos celulares y a la formación de quistes, seguido por la ruptura del folículo piloso y la liberación del contenido folicular a la dermis, provocando una importante expresión de mediadores inflamatorios y el reclutamiento de células inflamatorias. Este proceso acaba dando lugar finalmente a la formación de nuevos abscesos dolorosos, túneles, inflamación local y cicatrización [4][5].

Además de los estudios citados, existen otros como los de Yue *et al.* [3] que indican que hay varios factores exógenos asociados con la HS. Se ha observado que las hormonas juegan un papel muy importante en la aparición de esta enfermedad, ya que los medicamentos que contienen andrógenos suelen empeorarla. Otro problema que se puede añadir en este tipo de pacientes es la obesidad, dado que puede provocar un aumento de estrés mecánico en la piel agravando así la enfermedad. El tabaco es otro factor que afecta negativamente a la HS, en los estudios de Sartorius *et al.* [6] se observó una mayor incidencia de HS en personas fumadoras que en no fumadoras. Por otra parte, las observaciones de Canoui-Poitrine *et al.* [7] apuntan a que la HS está influenciada también por factores genéticos. Aproximadamente un tercio de los pacientes tienen algún miembro familiar con esta patología, lo que sugiere una predisposición genética heredable, probablemente por un modo de herencia autosómico dominante [7].

La HS puede presentar algunas comorbilidades y estar asociada a muchas enfermedades como pueden ser el síndrome de oclusión folicular, enfermedades autoinflamatorias, obesidad, síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias intestinales, síndromes genéticos y espondiloartropatías. Además, los trastornos psiquiátricos son muy frecuentes en estos pacientes, como la depresión o la aparición de ideas suicidas [8].

Para definir un tratamiento adecuado para la HS, es importante reconocer y clasificar adecuadamente las lesiones en los pacientes. Existen diferentes clasificaciones para catalogar esta enfermedad, pero la clasificación de Hurley es una de las más usadas. Esta clasificación es la más antigua y presenta algunos inconvenientes, como no incluir la localización y el número de sitios afectados, además de no reflejar el estadio inflamatorio, pero permite una evaluación rápida e intuitiva de las lesiones. Esta clasificación consta de tres estadios [8][9]:

- **Estadio I:** Lesiones primarias individuales y/o quistes sin fístulas o cicatrices.
- **Estadio II:** Lesiones primarias individuales y/o quistes con presencia de fístulas y cicatrices.
- **Estadio III:** Lesiones primarias y secundarias confluyentes en superficies afectadas con fístulas y cicatrices.

Aun cuando la HS es difícil de tratar y no existe cura definitiva para esta patología, existen algunos métodos efectivos para poder controlarla y mejorar algunos síntomas. Los objetivos de estos tratamientos se centran en prevenir nuevas lesiones, tratar de forma temprana y eficaz las lesiones emergentes y eliminar los nódulos y los túneles existentes. En general, el tratamiento para la HS se puede enfocar de tres formas distintas: Terapia no médica, terapia farmacológica, y cirugía [3].

- **Terapia no médica:** Se aplican medidas generales en todos los pacientes independientemente del estadio de la enfermedad en el que se encuentren. Estas medidas incluyen modificaciones en el estilo de vida, como dejar de fumar, perder peso y llevar una dieta sana y equilibrada. También es importante evitar el estrés mecánico en la piel causado por la ropa holgada. Otras medidas adicionales incluyen el uso de antisépticos tópicos y jabón antibacteriano [3][10].
- **Terapia farmacológica:** El enfoque médico es escalonado, comienzan con una terapia tópica para pacientes con una HS leve, y dejan la terapia sistémica para aquellos pacientes con HS moderada o grave [3].
 1. Medicamentos tópicos: El resorcinol es uno de los fármacos que se suelen administrar por vía tópica principalmente por su efecto queratolítico a altas

concentraciones (15 %). Un estudio de Van Straalen *et al.* [11] demostró que el resorcinol reducía el dolor de los nódulos inflamatorios en pacientes con un estadio I y III de Hurley. La clindamicina tópica (solución o gel al 1 %) también se suele emplear inicialmente para la HS leve o localizada. Este antibiótico por vía tópica puede disminuir la cantidad de lesiones o prevenir una infección secundaria [3].

2. Medicamentos orales: Para una HS generalizada se suelen utilizar antibióticos orales, entre los que se encuentran la tetraciclina, la clindamicina y la rifampicina. Estos se utilizan por sus efectos antiinflamatorios, y se requieren ciclos de 2 a 3 meses para lograr el control de la enfermedad. Las terapias antiandrogénicas también se suelen aplicar para tratar la HS, debido a que los andrógenos representan un papel importante en la aparición de esta enfermedad. Tanto el acetato de ciproterona como las píldoras anticonceptivas orales que contienen norgestrel mejoraron la HS en un estadio II y III de Hurley en el estudio de Sawers *et al.* [12] que se realizó con 24 mujeres. La finasterida también es un fármaco que ha demostrado ser eficaz. Otros fármacos que se pueden emplear son los agentes antidiabéticos. La liraglutida se emplea habitualmente para tratar la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, pero se ha observado que también es beneficiosa para tratar la HS. La metformina igualmente es un fármaco que se utiliza para tratar la diabetes al inhibir la gluconeogénesis y aumentar la sensibilidad a la insulina [13]. Sin embargo, en un estudio de Verdolini *et al.* [14] se demostró que la metformina también era eficaz para tratar la HS, debido a que disminuía la producción de andrógenos y la sensibilidad de sus receptores. En cuanto a los retinoides, los efectos inmunomoduladores y antiproliferativos de estos compuestos pueden controlar la inflamación en la HS. En un estudio de Boer *et al.* [15] el uso de acitretina en 12 pacientes con HS grave durante 9-12 meses solucionó las lesiones y alivió el dolor en los pacientes. Sin embargo, este retinoide no se recomienda en mujeres en edad fértil por sus efectos teratogénicos. Por otra parte, la isotretinoína también ha demostrado ser útil en los casos con HS moderada y grave, aunque también se considera un compuesto teratogénico pero con una vida media más corta [16].
3. Medicamentos sistémicos: Debido a que se cree que la HS es debida a una desregulación del sistema inmunológico innato y adaptativo, en ocasiones se emplean medicamentos inmunosupresores para tratar esta enfermedad. Las inyecciones de corticosteroides con acetónido de triamcinolona se suelen utilizar como terapia para eliminar los nódulos inflamatorios tempranos [17]. El ertapenem,

sin embargo, es un antibiótico que se administra por vía intravenosa, pero en el estudio de Lyons *et al.* [18] se demostró que es capaz de reducir la gravedad de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Asimismo, los tratamientos biológicos también se suelen administrar en aquellos pacientes que no responden bien a la terapia médica convencional. Tanto el infliximab como el adalimumab son eficaces en la HS moderada y grave [11].

- **Cirugía:** Este método permite remediar las cicatrices y los túneles asociados con la HS crónica, siendo también muy eficaz en lesiones aisladas. Se trata quirúrgicamente a aquellos pacientes con HS en estadio III cuyas lesiones son intratables, o a pacientes que no responden o tienen una respuesta parcial a las demás terapias existentes. No obstante, la cirugía no es considerada un método curativo definitivo, por lo que, aunque se emplee este método, los pacientes afectados deberán continuar tanto con las medidas generales como con terapia farmacológica [3][19].

1.2. RETINOIDES

Los retinoides son compuestos químicos que derivan de la vitamina A o del todo-*trans*-retinol (Figura 1), aunque también se pueden sintetizar químicamente. La vitamina A está formada por tres dominios estructurales: Un anillo cíclico, una cadena lateral de polieno y un grupo polar final. Esta vitamina es una molécula hidrofóbica que no puede ser sintetizada por el cuerpo humano, por lo que se debe adquirir a través de la dieta. Se absorbe en el intestino delgado, y una vez dentro del organismo se convierte en varios metabolitos, los retinoides, que se diferencian entre ellos principalmente por su grupo terminal polar [20].

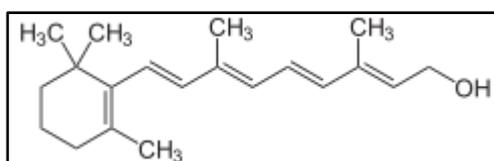


Figura 1: Vitamina A.

Los retinoides son compuestos que influyen en la división celular y en la diferenciación de las estructuras estratificadas de la epidermis. De hecho, algunas respuestas fisiológicas de la piel, como la cicatrización, el envejecimiento dérmico y la defensa inmunitaria, se ven significativamente influenciadas por estas moléculas. Estos retinoides pueden ser naturales (derivados de la vitamina A), o sintéticos. Los retinoides sintéticos se pueden clasificar en tres generaciones; Los retinoides de primera generación (isotretinoína, alitretinoína etc.), que están formados por compuestos no

aromáticos. Los retinoides de segunda generación (acitretina y etretinato) que incluyen compuestos monoaromáticos. Y, por último, los retinoides de tercera generación (tazaroteno, adapaleno etc.), que engloban compuestos poliaromáticos [21].

Existen dos clases principales de receptores en el organismo que se unen a los retinoides; las proteínas de unión a los retinoides y los receptores nucleares de retinoides. Las proteínas de unión a los retinoides, son necesarias para la estabilización de los retinoides hidrofóbicos en medios acuosos. Estas proteínas pueden dividirse en la proteína plasmática de unión al retinol (RBP4), la proteína de unión al retinol intersticial (RBP3), las proteínas celulares de unión al retinol (RBP1, RBP2, RBP5 y RBP7) y las proteínas citoplasmáticas de unión al ácido retinoico (CRABP I y CRABP II). [22] En cambio, los receptores nucleares de retinoides, se pueden dividir en dos familias; los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores de retinoides X (RXR). Los RAR se unen al ácido *trans*-retinoico y al ácido 9-*cis*-retinoico, los dos principales derivados naturales de la vitamina A, mientras que los RXR solo se unen al ácido 9-*cis*-retinoico [23].

La administración oral de algunos retinoides, como la acitretina o la isotretinoína, provocan una serie de efectos secundarios graves en el organismo, entre los que se encuentra la teratogenicidad, la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, hepatotoxicidad, y otros menos graves como la alopecia, cefaleas y sequedad mucocutánea [24] [25]. Por este motivo, en este trabajo se han seleccionado estos dos retinoides para encapsularlos por separado en nanofibras poliméricas, con el objetivo de encontrar una nueva terapia por vía tópica para tratar la HS.

La acitretina (Figura 2) es el metabolito farmacológicamente activo del etretinato, y se metaboliza en 13-*cis*-acitretina, actuando sobre las proteínas citosólicas y los receptores intranucleares que forman parte de la familia de las hormonas esteroideas. Los metabolitos de la acitretina se unen a los receptores RAR mediante su unión a las proteínas CRABP, y provocan una alteración en la transcripción de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular. De este modo, este retinoide impide una proliferación excesiva de queratinocitos y fibroblastos. La acción farmacológica de la acitretina también tiene efectos sobre la apoptosis, la angiogénesis, la queratinización, la secreción de sebo y la inmunomodulación. De hecho, su acción antiinflamatoria inhibe la migración de los neutrófilos desde la dermis a la epidermis [21][24].

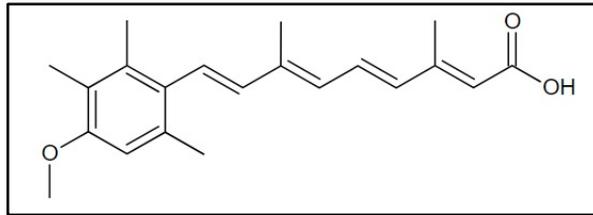


Figura 2: Acitretina.

Existen muy pocos estudios acerca de la aplicación tópica de la acitretina para tratar enfermedades dermatológicas, pero algunos estudios de absorción percutánea realizados en animales y en humanos por Hsia *et al.* [26] han sugerido que la aplicación por vía tópica de este retinoide puede producir concentraciones dérmicas que superan las alcanzadas con la administración oral. Esta administración tópica también aumentaría la biodisponibilidad local en el lugar de acción, y disminuiría la exposición sistémica del retinoide, proporcionando así una forma más segura para tratar algunas enfermedades de la piel debido a que se lograría disminuir algunos de los efectos secundarios [26].

En cuanto a la isotretinoína (ácido 13-*cis*-retinoico) (Figura 3), es el medicamento más eficaz para tratar el acné grave. Este fármaco ejerce su acción sobre muchos de los factores implicados en la patogénesis del acné, como la actividad androgénica, la producción de sebo, las bacterias y la inflamación, disminuyendo además la diferenciación y proliferación de los sebocitos. El mecanismo de la isotretinoína no se conoce todavía con claridad, pero al parecer se considera un profármaco que ejerce muchos de sus efectos isomerizándose en tretinoína (ácido todo-*trans* retinoico), el cual se une específicamente a CRABP y a RAR para ejercer un efecto antiproliferativo en los sebocitos [27] [28]. No obstante, algunos estudios de Imam *et al.* [29] sugieren que la isotretinoína también actúa de manera independiente de los receptores de retinoides, influyendo en vías de señalización celular a través de interacciones proteicas o por inhibiciones enzimáticas. En relación a la administración tópica de este retinoide, existen muchos más estudios de este tipo enfocados generalmente en la reparación de la piel fotodañada [30] [31].

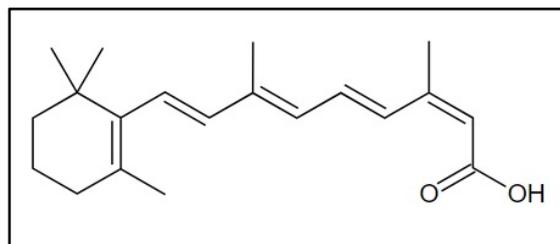


Figura 3: Isotretinoína.

1.3. ELECTROSPINNING Y NANOFIBRAS

El *electrospinning* (electrohilatura), es una técnica muy utilizada en el campo de la nanotecnología, este método emplea fuerzas eléctricas para la formación de fibras electrohiladas a partir de disoluciones poliméricas formadas por polímeros naturales o sintéticos [32]. Es una técnica muy antigua, descubierta por primera vez en 1897 por Rayleigh, estudiada detalladamente por Zeleny en 1914 y patentada por Formhals en 1934 [33]. Esta metodología permite obtener fibras de diversas longitudes, tamaños y porosidades. Además, esta técnica se distingue por su sencillez, versatilidad, efectividad, bajo coste, facilidad de implantación y por la posibilidad de usarla para un escalado industrial [34].

Este método consiste en aplicar un elevado voltaje generado por un campo electrostático entre dos polos mediante un generador de corriente. El equipo está formado por un sistema de inyección que empuja una disolución polimérica cargada en una jeringa mediante el uso de una bomba peristáltica, y la hace salir por una aguja en dirección al colector metálico donde se depositarán las nanofibras, formando una película de baja relación peso-volumen [32]. El control de las características morfológicas de las fibras electrohiladas se logra perfeccionando los parámetros del *electrospinning*, incluyendo las condiciones experimentales y la disolución polimérica [35].

La colocación del equipo puede ser horizontal o vertical. En este Trabajo Fin de máster (TFM) se ha trabajado con la disposición horizontal, debido a que, si hay disolvente que no se evapora, este caerá hacia abajo y no diluirá las fibras al caer sobre ellas. No obstante, un inconveniente de utilizar esta colocación es que podemos tener pérdidas de material en el caso de que no toda la disolución forme fibras.

La siguiente figura (Figura 4) [36] representa la disposición del equipo en forma horizontal. A la izquierda se encuentra la jeringa cargada con la disolución polimérica y los componentes necesarios previamente disueltos y sin burbujas. Se coloca una bomba de infusión dónde está situada la jeringa para empujar el fluido y así conseguir el flujo deseado. La bomba empuja al émbolo, generando una presión estable que se transmite a la disolución del polímero en la aguja. Con relación al campo eléctrico, éste produce una polarización y carga que origina que la disolución sea atraída en forma de chorro denominado *jet* hacia la superficie conductora. La aguja está situada a una distancia definida del colector según los ajustes previos y conectada a su vez a un potencial cero. El disolvente se va evaporando gradualmente a medida que atraviesa la distancia entre la aguja y el colector, de este modo se consiguen fibras distribuidas al azar que acaban depositándose en el colector situado a la derecha [32] [37].

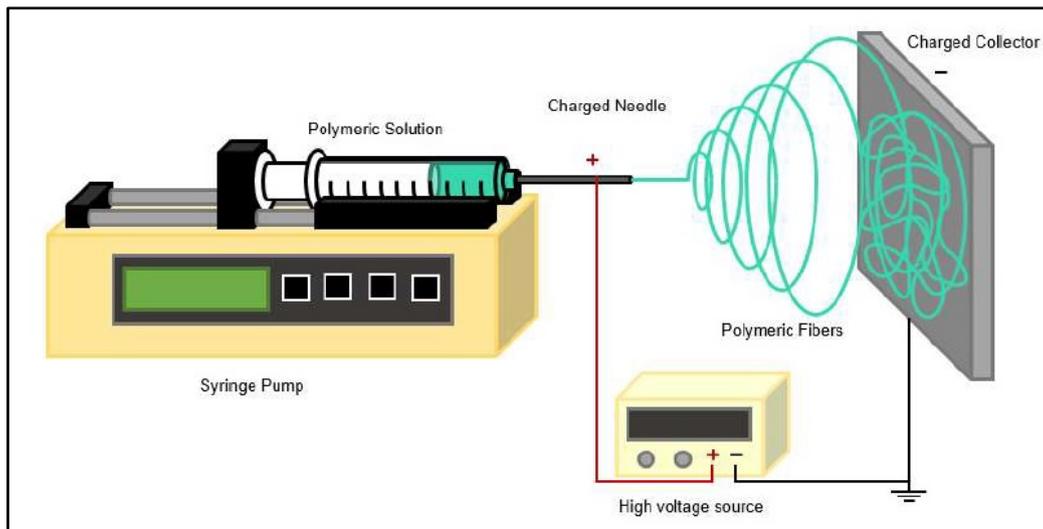


Figura 4: Equipo de *electrospinning* en disposición horizontal.

Durante el recorrido entre los dos electrodos (colector y punta de la aguja) se produce un fenómeno conocido como cono de Taylor. En este suceso, se inducen cargas en el fluido durante esa trayectoria, lo que provoca que se rompa la tensión superficial debido al campo eléctrico y se descomponga en una fuerza tangencial y una normal. La corriente aplicada en esta operación es de alto voltaje con una intensidad reducida (orden de microamperios), y genera una aceleración significativa en el *jet*, de forma que su diámetro va disminuyendo. Este *jet* se solidifica y acaba convirtiéndose en una fibra de escala nanométrica [38].

Es muy importante mantener un control operacional del equipo de *electrospinning*, debido a que las propiedades de las fibras pueden verse afectadas por diversos parámetros. Estos parámetros operacionales se pueden clasificar en tres grupos [39] [40]:

1. **Parámetros de la disolución:** Tipo de polímero empleado, viscosidad, conductividad, concentración del polímero, densidad de carga en la superficie, constante dieléctrica del disolvente y tensión superficial.
2. **Parámetros del equipo:** Velocidad del flujo, potencial eléctrico, distancia entre la aguja y el colector y tipo de colector.
3. **Parámetros ambientales:** Humedad relativa, temperatura de la disolución y velocidad del aire en la cámara de *electrospinning*.

No obstante, durante el proceso de *electrospinning* pueden darse interrelaciones entre estos parámetros que pueden dificultar el electrohilado y afectar en mayor medida a la morfología de las fibras [40].

La concentración de la disolución es uno de los parámetros más importantes que va a influir en el tamaño y morfología de las fibras. La concentración de polímero influirá tanto en la viscosidad como en la tensión superficial de la disolución. Cuanto más viscosa es la disolución, mayor diámetro tendrán las fibras resultantes. Sin embargo, si la disolución está muy diluida estas fibras se pueden llegar a romper antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial, y no se formarán si la disolución está muy concentrada debido a la alta viscosidad, que entorpece el paso de la disolución a través de la aguja [41] [42].

En consideración con los parámetros del equipo, el voltaje es uno de los factores más importantes en la técnica de *electrospinning*. Algunos estudios de Deitzel *et al.* [43] sugieren que voltajes altos resultan en fibras con menor diámetro. De hecho, en la mayoría de los casos es así, un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la disolución debido a la presencia de una mayor fuerza de Coulomb en el *jet*, promoviendo una reducción en el diámetro de las fibras. Otro parámetro muy importante es el flujo de salida de la disolución desde la aguja, un flujo pequeño puede ser beneficioso debido a que el disolvente dispone de más tiempo para evaporarse, evitando así la formación de defectos en las fibras. En cambio, si se incrementa este flujo es muy probable que resulte en un aumento en el diámetro de las fibras o en la aparición de defectos en estas. Se necesita un valor mínimo de volumen de disolución a la salida de la aguja para mantener estable el cono de Taylor [40].

Dentro de los parámetros del equipo también se encuentra la distancia entre la aguja y el colector. La variación de esta distancia influye en las fibras, viéndose influida además por las propiedades de la disolución. Las fibras pueden romperse si se trabaja con distancias muy grandes, pero se requiere una distancia mínima para que el disolvente pueda evaporarse a tiempo antes de que las fibras se depositen en el plato colector. Se ha observado la aparición de gotas (*bealds*) en distancias excesivamente grandes o muy pequeñas [35].

Respecto a los parámetros ambientales, un estudio de Sencadas *et al.* [44] demostró que una humedad muy alta favorece la presencia de gotas en las fibras. La humedad en el ambiente puede determinar la velocidad de evaporación del disolvente, un disolvente volátil puede evaporarse muy rápido si la humedad relativa es muy baja. Por otra parte, la temperatura también influye en la morfología de las nanofibras, una temperatura alta puede incrementar la evaporación del disolvente y reducir la viscosidad de la disolución [44].

En la siguiente tabla (Tabla1) se resumen los efectos en la morfología de las fibras provocados por estos parámetros explicados.

Tabla 1: Parámetros operacionales y efectos en el *electrospinning*.

	Parámetros	Efectos en la morfología de la fibra
Solución polimérica	Peso molecular	Es necesario un peso molecular alto para poder obtener fibras.
	Concentración	- A concentraciones muy altas se obtienen fibras de mayor grosor. - A concentraciones muy bajas no se obtienen fibras o aparecen de forma discontinua.
	Conductividad	Una alta conductividad favorece la uniformidad de las fibras, un menor tamaño y menos defectos.
	Tensión superficial	Si la tensión superficial es alta crea inestabilidad en el haz con aparición de defectos.
Equipo	Distancia aguja-colector	Existe una distancia óptima para la obtención de fibras, que implica que se formen aglomeraciones.
	Velocidad de flujo	Velocidades grandes no permiten la evaporación de disolvente, y velocidades pequeñas disminuyen el grosor de las fibras.
	Voltaje	Un voltaje elevado implica mayor campo eléctrico que provoca estrechamiento de la fibra y favorece la evaporación del disolvente.
Ambiente	Temperatura	La temperatura afecta directamente a la viscosidad de la disolución polimérica. - A una mayor temperatura disminuye la viscosidad y por lo tanto el diámetro de las fibras.
	Humedad relativa	Valores de humedad altos conducen a la formación de poros en las fibras, y con valores bajos, el disolvente puede evaporarse más rápido y obstruir la aguja.

En general, para poder elaborar y caracterizar correctamente las fibras mediante la técnica de *electrospinning* hay que tener en cuenta tres características importantes [35]:

- **Distribución monomodal:** Los diámetros de las fibras obtenidas tienen que ser representativos y controlables.
- **Ausencia de defectos:** La superficie de las fibras no debe presentar defectos, por ejemplo, la formación de gotas.
- **Fibras no amontonadas:** Las fibras tienen que estar aisladas, sin aglomeraciones, para facilitar su estudio y caracterización.

Las nanofibras han adquirido un gran interés en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas por vía tópica, normalmente en forma de parches transdérmicos, apósitos o implantes biodegradables.

La encapsulación de fármacos en nanofibras puede aumentar significativamente la protección de estos productos farmacéuticos frente a la degradación ambiental, conseguir una administración localizada o generar una liberación controlada de estos fármacos. Las características comentadas de las nanofibras les otorgan gran interés, debido a que de este modo se puede mejorar la eficacia de algunas sustancias terapéuticas, por ejemplo, aumentando sus semividas, reduciendo sus dosis o disminuyendo algunos de sus efectos secundarios [45] [46].

Un requerimiento fundamental que tienen que presentar estas nanofibras para emplearlas en el campo de la biomedicina, es que tienen que estar compuestas por materiales biocompatibles que hayan demostrado no presentar toxicidad sobre tejidos y organismos vivos. Por tanto, se suelen emplear polímeros sintéticos (poliésteres, polialcoholes etc.) o biopolímeros (quitina, quitosano, colágeno etc.) [40].

En relación con las aplicaciones terapéuticas que están hoy en día en desarrollo, cabe resaltar la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. En estas disciplinas suelen emplear las nanofibras para fabricar estructuras tridimensionales porosas con el objetivo de simular una matriz extracelular y estimular el crecimiento celular. Se han aplicado mayoritariamente en la regeneración *in vivo* de heridas y lesiones, y para la fabricación de tejidos *in vitro* [46] [47].

Por último, si realizamos una búsqueda en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ingresando el término “*nanofibers*” (nanofibras en inglés) se puede observar el gran incremento de publicaciones relacionadas con las nanofibras en los últimos años y, en consecuencia, la gran importancia que presenta este tipo de estructuras en la actualidad (Figura 5).

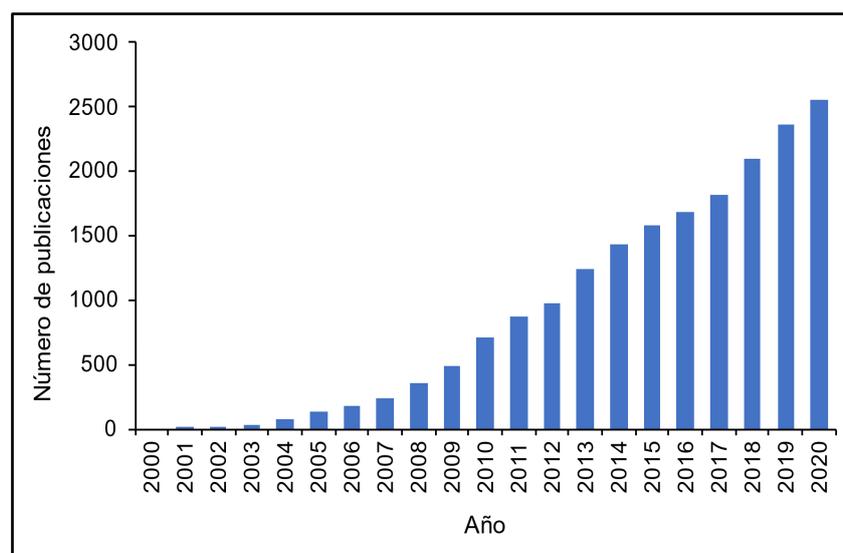


Figura 5: Número de publicaciones con el término “*nanofiber*” desde 2002 hasta 2020. Fuente: NCBI (PubMed).

1.4. POLÍMERO

La síntesis controlada de materiales nanométricos ha ofrecido a la comunidad biomédica una nueva clase de dispositivos regenerativos y terapéuticos. Esta clase de materiales son especialmente adecuados para aplicaciones biomédicas, debido a que operan en la misma escala de tamaño que las estructuras biológicas y las moléculas [48].

En este contexto, algunos polímeros tienen la ventaja de comprender una gran variedad de moléculas biodegradables y compatibles que los hacen adecuados para la creación de diferentes tipos de nanoestructuras cargables con determinados fármacos, entre las que se encuentran las nanofibras. El uso de estos polímeros para la síntesis de nanofibras puede emplearse para contener moléculas de diferente naturaleza, solubilidad, tamaño, y para controlar su liberación durante periodos de tiempo prolongados [49]. Como ejemplos de este tipo de materiales, encontramos los derivados del PMVEMA-AN (poli (metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico)), un copolímero alterno de metil-éter-vinilo y anhídrido maleico. Este material lo comercializa Ashland Inc. como Gantrez®, y presenta propiedades idóneas para utilizarlas en aplicaciones biomédicas (alta biocompatibilidad, baja toxicidad, bajo coste y alta moco adhesividad) [50].

La reactividad del PMVEMA-AN (Figura 6) provoca que reaccione con una gran variedad de grupos nucleofílicos, dando lugar a otros derivados como el PMVEMA-ES (poli (metil vinil éter- *alt*-maleico) éster monoetílico) al reaccionar con un alcohol, y el PMVEMA-Ac (poli (metil vinil éter- *alt*-ácido maleico)) al reaccionar con agua [40].

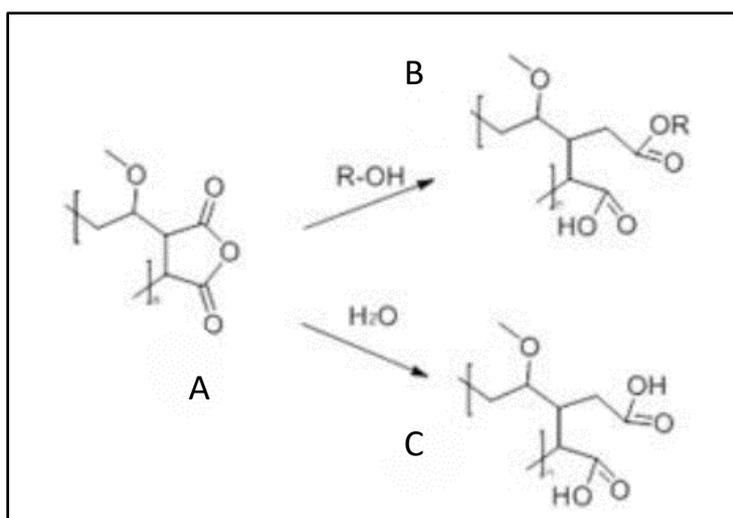


Figura 6: Esquema del PMVEMA-AN (A) y sus derivados PMVEMA-ES (B) y PMVEMA-Ac (C).

En relación a la solubilidad de estos derivados, el PMVEMA-ES es soluble en etanol (y parcialmente soluble en agua), por lo que el grado de homogeneidad en el que se incorporan los principios activos en las nanofibras y la forma en que quedan distribuidos en ellas, estará influenciada por la solubilidad de estos compuestos en la disolución polimérica y por el tipo de disolvente empleado [51]. En cambio, el PMVEMA-Ac es soluble en agua y etanol, y viene en forma de un polvo blanco que se disuelve completamente en agua dando lugar a una disolución transparente [40].

En consideración, para este TFM, se han empleado estos dos derivados del PMVEMA-AN para la elaboración de distintos tipos nanofibras poliméricas cargadas con dos tipos de retinoides por separado, acitretina e isotretinoína. Como se ha mencionado anteriormente, este tipo de polímeros presentan propiedades biocompatibles, biodegradables, bioadhesivas, y presentan muy baja toxicidad, por lo que se emplean y se comercializan para diferentes aplicaciones en el campo de la biomedicina, y por tanto, están aprobados por la FDA para ser utilizados como excipientes en formulaciones para administración tópica [35] [49] [52].

Así pues, después de analizar la situación actual de la HS, con este Trabajo Fin de Máster, se pretende elaborar una nueva forma farmacéutica que son estas nanofibras incorporadas en parches transdérmicos para su tratamiento, y así poder eliminar o minimizar algunos de los efectos secundarios que conllevan las terapias actuales para esta enfermedad.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo general, el desarrollo de nanofibras poliméricas biocompatibles desarrolladas con los derivados del poli (metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico) (PMVEMA-AN); el éster monoetílico de poli (metil vinil éter- *alt*- ácido maleico) éster monoetílico (PMVEMA-ES), y el poli (metil vinil éter- *alt*-ácido maleico) (PMVEMA-Ac). Estas nanofibras se emplearán como sistema de administración transdérmico incorporando dos tipos de retinoides (acitretina e isotretinoína) para una posible aplicación en el tratamiento de la HS.

Con el fin de desarrollar dicho objetivo general, se establecieron distintos objetivos específicos mostrados a continuación:

1. Optimizar las condiciones idóneas para el desarrollo de nanofibras electrohiladas a partir de diferentes disoluciones poliméricas de PMVEMA: PMVEMA control y PMVEMA con 0,05 % en peso de retinoide: acitretina o isotretinoína. Las disoluciones de PMVEMA empleadas fueron:
 - PMVEMA-ES 25 % p/p
 - PMVEMA-Ac 15 % p/p
 - PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p
2. Caracterización físico-química de las nanofibras mediante diferentes técnicas.
3. Estudio de la estabilidad en el tiempo de los retinoides encapsulados en las nanofibras.
4. Aplicaciones biotecnológicas de las nanoestructuras en diferentes ensayos *in vitro*: Cinética de liberación y ensayos celulares.

En este proyecto se empleará la nanotecnología para desarrollar sistemas nanoestructurados transdérmicos con el objetivo de disminuir los efectos secundarios que generaran los fármacos utilizados en esta investigación: Acitretina e isotretinoína.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES

Todos los productos químicos que se utilizaron en los diferentes ensayos de laboratorio se muestran a continuación:

- Acitretina: “Ácido 9-(4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)-3,7-dimetilnona-2,4,6,8-tetraenoico” (CAS:55079-83-9) proporcionada por Sigma-Aldrich Chemistry. Polvo amarillo de peso molecular 326,43 g/mol y una pureza de 98 % (HPLC).
- Ácido acético glacial puro (CAS:64-19-7) proporcionado por PanReac AppliChen.
- Agua miliQ desionizada y filtrada proveniente de un sistema Milli-Q Synthesis A10 (Millipore, Madrid. España).
- Etanol para espectroscopía (CAS:64-17-5) proporcionado por Merck (Darmstadt. Alemania).
- Isotretinoína: “Ácido 13-*cis*-retinoico” (CAS:4759-48-2) proporcionada por Sigma-Aldrich Chemistry. Polvo granulado naranja de peso molecular 300,44 g/mol y una pureza de 98 % (HPLC).
- PMVEMA-Ac: “poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maleico)” (CAS:25153-40-6) proporcionado por Sigma-Aldrich Chemistry. Peso molecular de 1.980.000 g/mol. Formato en polvo blanco.
- PMVEMA-ES: “poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maleico monoetil éster)” (CAS:25087-06-3) proporcionado por Sigma-Aldrich Chemistry. Peso molecular de 130.000 g/mol, en una concentración de 50 % de peso en etanol y densidad 0,983 g/ml a 25 °C.
- PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, por sus siglas en inglés) Dulbecco (*w/o Magnesium, w/o Calcium*), proporcionado por biowest.
- Tetrahidrofurano (THF) proporcionado por Honeywell Riedel-de Haën. Con una pureza de 99,9 % (HPLC).

3.2. INSTRUMENTACIÓN

3.2.1. Equipo de *electrospinning*

El equipo de *electrospinning* (Figura 7) estaba formado por una bomba de infusión, una fuente de alta tensión, una caja protectora y una jeringa con una aguja.

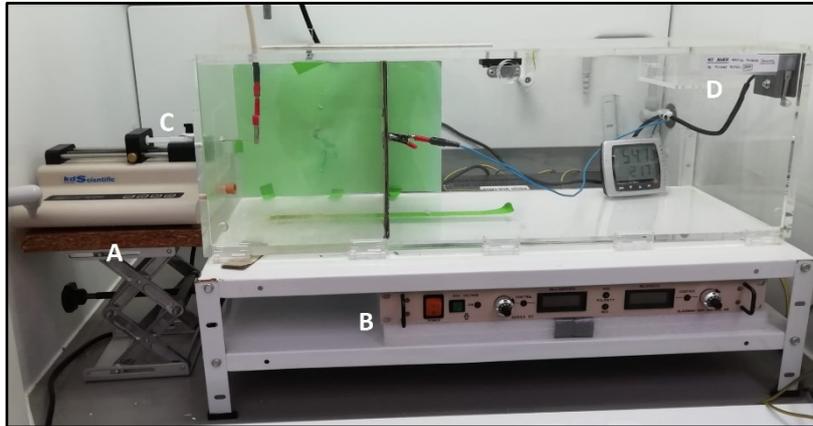


Figura 7: Equipo de *electrospinning*. **A.** Bomba de infusión. **B.** Fuente de alta tensión. **C.** Jeringa con aguja. **D.** Caja protectora.

La bomba de infusión (modelo KdScientific 100), es un aparato que ejerce su acción empujando el émbolo de la jeringa de forma constante por un pistón gracias a la programación de una velocidad definida según la sustancia, permitiendo la dosificación de la disolución polimérica hasta la aguja con un flujo firme.

La fuente de alta tensión (Glassman High Voltage Inc., modelo FC60P2) es un equipo que produce una diferencia de potencial entre dos polos, generando un campo eléctrico entre el colector y la aguja. La aguja empleada (Sigma-Aldrich) es de acero inoxidable 316, con un calibre de 20 (0,902 mm (milímetros) de diámetro externo y 0,584 mm de diámetro interno), una longitud de 101,6 mm y está conectada a uno de los electrodos de la fuente de alta tensión, de ella sale la disolución polimérica que dará lugar a las nanofibras mediante la formación del cono de Taylor. Esta aguja está colocada en una jeringa (Becton Dickinson Discardit) de 2 ml (mililitros), cuyo material debe de ser inerte para que no interaccione con la disolución polimérica empleada.

Todos estos componentes del equipo de *electrospinning* se encuentran en el interior de una caja protectora de metacrilato para aislar el montaje durante el proceso de electrohilado. Esta caja es un elemento de seguridad que evita un contacto directo del equipo con la persona que lo está manipulando, ya que el voltaje durante el proceso puede ser muy alto. Además, esta caja tiene implantado un mecanismo que apaga la fuente de alta tensión en el caso de que esta se abriera por accidente.

3.2.2. Espectrofotómetro UV-Vis.

Se empleó un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-2700 junto con el software UVProbe versión 2.43, para estudiar la estabilidad en el tiempo de los retinoides en los diferentes tipos de disoluciones poliméricas, y para analizar los resultados de la cinética de liberación en el tiempo de estos fármacos en uno de los ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz.

Para ello se emplearon dos cubetas de sílice de cuarzo (Hellma®, modelo 110-QS) con tapón, y con una trayectoria óptica de 10 mm. En ambos tipos de ensayos se programó un barrido de longitudes de onda comprendido entre 200-600 nanómetros (nm) para realizar las curvas de calibrado de los dos retinoides y para medir la absorbancia de las muestras.

Para la curva de calibrado de la acitretina, se disolvió en un matraz aforado 3 mg (miligramos) del retinoide en 10 ml de THF (debido a que este retinoide es más soluble en este disolvente). A partir de esta disolución, se realizaron diversas diluciones empleando siempre el THF como diluyente, y se midieron las absorbancias de esas diluciones en el espectrofotómetro. Para la curva de calibrado de la isotretinoína, se disolvió también en un matraz aforado 3 mg del retinoide en 10 ml de etanol, y se realizaron diluciones a partir de esta disolución empleando etanol como diluyente. Posteriormente, se midieron las absorbancias de estas diluciones en el espectrofotómetro. Cada recta de calibrado se hizo por duplicado.

3.2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La técnica de HPLC (del en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) se empleó para cuantificar la cantidad de retinoide que había en las fibras en los ensayos de estabilidad en el tiempo de las nanofibras y para cuantificar la cantidad de retinoide liberado en uno de los ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz.

El equipo utilizado para llevar a cabo el análisis de los dos tipos de retinoides fue un HPLC Hitachi (Merck Hitachi LaChrom). Este equipo está formado por una bomba L-7100, un horno para la columna, y un detector de diodo array L-7455. Los datos se analizaron con el software D-700 HSM para LC system. Para desarrollar este ensayo, se empleó una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y una precolumna (4 x 4 mm i.d.) para ambos retinoides. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente equilibrando la columna durante 30 minutos antes del análisis de las muestras.

Se elaboraron por duplicado curvas de calibrado para ambos retinoides, para ello los principios activos fueron disueltos en etanol a diferentes concentraciones en un rango comprendido entre 5-30 µg (microgramos)/ml. Se observó una correlación lineal entre la concentración de los retinoides y el valor del área delimitada por el pico detectado para cada tipo de retinoide en el cromatograma y la

línea basal. La curva de calibrado para los ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz se realizaron en etanol:PBS (1:1) con el mismo rango de concentraciones.

Para el análisis cromatográfico de ambos retinoides se seleccionó un método isocrático, descrito en la farmacopea europea [53], con una fase móvil de etanol:agua 92:8 (v/v) con un 0,3 % de ácido acético. El flujo fue de 0,6 ml/min y las condiciones cromatográficas fueron: Volumen de inyección de 20 μ l (microlitros), tiempo de análisis de 10 minutos y la longitud de onda a la que se leyeron los datos fue de 350 nm para la isotretinoína y 360 nm para la acitretina.

3.2.4. Celdas de Franz

Las celdas de Franz (Figura 8) (PermeGear, con cámara exterior, orificio de 9mm (0,64) y un volumen receptor de 5 ml) se emplearon para estudiar la cinética de liberación *in vitro* de los retinoides encapsulados en las nanofibras poliméricas.

El equipo estaba formado por 6 celdas de Franz (Figura 9), y cada una de ellas estaba compuesta a su vez por un compartimento donador y un compartimento receptor separados mediante una membrana (Strat-M, EMD Millipore Corporation). El compartimento receptor contiene el medio de disolución donde se libera el principio activo y un brazo donde se recogen las muestras a diferentes tiempos. El equipo incluye un sistema de agitación magnética (IKA Laboratory Equipment) a 200 r.p.m en el compartimento receptor, y un baño termostático (Selecta Digiterm-100) que hace circular agua en la cámara exterior de estas celdas para mantener todo el conjunto a 32 ± 1 °C (temperatura de la piel).

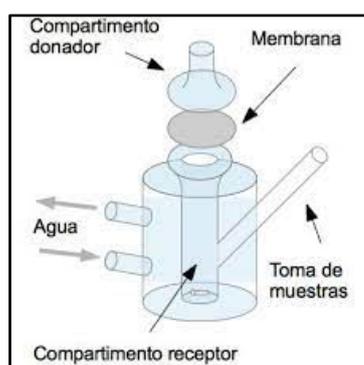


Figura 8: Celda de Franz.

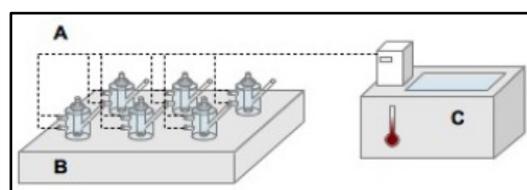


Figura 9: A. Celdas de Franz. B. Sistema de agitación magnética. C. Baño termostático.

En los dos ensayos que se realizaron, los compartimentos receptores se rellenaron con PBS (solución tampón) antes de colocar las muestras y cerrar las celdas con una pinza metálica. Además, en ambos ensayos se emplearon parches transdérmicos en algunas de las celdas (Skinfilm, Barna Import Medica S.A).

3.3. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS

3.3.1. Disoluciones poliméricas de PMVEMA-ES 25 % p/p

Todas las disoluciones poliméricas de PMVEMA-ES se realizaron al 25 % p/p debido a que existen estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio por Mira *et al.* [49] que indican que con esa concentración de polímero las fibras presentan mejores características

Para elaborar la disolución polimérica control de PMVEMA-ES 25 % p/p, se pesaron 6 gramos (g) de PMVEMA-ES 50 % p/p en etanol (producto comercial) y se añadieron 6 g de etanol. La disolución se mezcló con la ayuda de un imán y un agitador magnético a 200 revoluciones/minuto (rpm) en un recipiente herméticamente cerrado, a temperatura ambiente y durante 1 hora.

La disolución polimérica de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05 % de isotretinoína se preparó disolviendo en primer lugar 1,5 mg del retinoide en 3 g de etanol con una posterior sonicación durante 15 minutos para lograr la completa disolución del retinoide. A continuación, se pesaron 6 g de PMVEMA-ES (50 %) a los que se les añadió la isotretinoína disuelta en el etanol, junto con otros 3 g del mismo disolvente para alcanzar un 25 % de concentración del polímero. La disolución se realizó en un recipiente herméticamente cerrado y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para obtener la disolución polimérica de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05 % de acitretina, se disolvió previamente 1,5 mg del retinoide en 0,134 g de THF y 3 g de etanol, sonicándolo posteriormente durante 15 minutos. Seguidamente, se pesaron 6 g de PMVEMA-ES (50 %) y se añadió la acitretina disuelta en THF y etanol junto con otros 2,866 g de etanol para alcanzar un 25 % de concentración del polímero. Esta disolución también se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizó en un recipiente herméticamente cerrado.

Tanto la acitretina como la isotretinoína se manejaron bajo una luz amarilla tenue para evitar su fotodegradación. Estos retinoides suponen un 0,05 % de concentración con respecto a la cantidad total de polímero debido a que se tomó como referencia el medicamento el gel Isotrex, cuya concentración de isotretinoína es de 0,5 mg/g.

3.3.2. Disoluciones poliméricas de PMVEMA-Ac 15 % p/p

Las disoluciones poliméricas de PMVEMA-Ac se realizaron al 15 % p/p en etanol debido a que, tras varias pruebas realizadas en el laboratorio, se observó que a esa concentración de polímero y empleando etanol como disolvente las fibras resultantes poseían las características deseables.

La disolución polimérica control de PMVEMA-Ac 15 % p/p se elaboró añadiendo 5,66 g de etanol en un vial, al que luego se añadió 1 g de PMVEMA-Ac con la ayuda de una cucharilla mientras la

disolución estaba en agitación magnética a 200 r.p.m. El vial con la disolución se cerró herméticamente y se dejó en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente.

Para elaborar la disolución polimérica de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de isotretinoína se disolvió en un vial 1 mg del retinoide en 3 g de etanol, sonicándolo posteriormente durante 15 minutos. A continuación, en ese mismo vial se añadieron otros 8,33 g del mismo disolvente y con la ayuda de una cucharilla, se añadieron 2 g de PMVEMA-Ac mientras la disolución estaba en agitación magnética para conseguir una concentración de polímero del 15 %. El vial se cerró herméticamente y la disolución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente.

La disolución polimérica de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de acitretina se preparó disolviendo en un vial 1 mg del retinoide en 0,089 g de THF y 3 g de etanol, con una posterior sonicación durante 15 minutos. Seguidamente en ese mismo vial se agregaron otros 8,24 g de etanol y con una cucharilla, se añadieron 2 g de PMVEMA-Ac mientras la disolución estaba en agitación magnética para conseguir una concentración de polímero del 15 %. El vial se cerró herméticamente y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente hasta su completa disolución.

3.3.3. Disoluciones poliméricas de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p

Las disoluciones poliméricas con la mezcla de polímeros PMVEMA-ES y PMVEMA-Ac se realizaron utilizando la misma proporción de polímero para cada uno de ellos (7,5 %) y empleando etanol como disolvente. Las disoluciones se elaboraron con un 15 % de polímero total debido a que, tras varias pruebas realizadas en el laboratorio, se observó que a esa concentración de los polímeros y utilizando etanol como disolvente las fibras resultantes presentaban mejores características.

Para elaborar la disolución polimérica control de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p, se pesaron 2 g de PMVEMA-ES (50 %) en un vial al que luego se añadieron 10,33 g de etanol. La disolución se agitó con la ayuda de un imán y un agitador magnético a 200 r.p.m durante 5 minutos. Seguidamente, mientras la disolución estaba en agitación magnética, se le añadió 1 g de PMVEMA-Ac con la ayuda de una cucharilla para alcanzar una concentración de polímero total del 15 %. La disolución resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en el recipiente herméticamente cerrado.

La disolución polimérica de PMVEMA-ES/Ac 15 % con 0,05 % de isotretinoína, se preparó disolviendo previamente en un vial 1 mg del retinoide en 3 g de etanol, sonicándolo posteriormente durante 15 minutos. A continuación, se pesaron 2 g de PMVEMA-ES (50 %) en otro vial al que se le añadió el retinoide disuelto en etanol, junto con otros 7,33 g del mismo disolvente, dejando la disolución en agitación durante 5 minutos. Posteriormente, se pesó 1 g de PMVEMA-Ac y mientras la disolución estaba en agitación, se añadió con una cucharilla a los demás componentes para lograr una

concentración de polímero total del 15 %. La disolución final se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en el recipiente herméticamente cerrado.

Para obtener la disolución polimérica de PMVEMA-ES/Ac con 0,05 % de acitretina, se disolvió previamente en un vial 1 mg del retinoide en 0,089 g de THF y 3 g de etanol, para después sonificarlo durante 15 minutos. Después se pesaron 2 g de PMVEMA-ES (50 %) en otro vial al que se le añadió el retinoide disuelto en THF y etanol y otros 7,23 g de etanol, dejando la disolución en agitación durante 5 minutos. Seguidamente se pesó 1 g de PMVEMA-Ac y mientras la disolución estaba en agitación, se le añadió esta cantidad de polímero con la ayuda de una cucharilla para conseguir una concentración de polímero total del 15 %. La disolución final se agitó a temperatura ambiente durante dos horas con el recipiente herméticamente cerrado.

3.4. VISCOSIDAD DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS

Se empleó un viscosímetro Cannon Fenske de serie 300 y número 4808 (V300) para medir la viscosidad de las disoluciones control de PMVEMA-ES 25 % p/p y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p, y un viscosímetro Cannon Fenske de serie 400 y número 4834 (V400) para medir la viscosidad de la disolución control PMVEMA-Ac 15 % p/p (Figura 10).



Figura 10: Viscosímetro Cannon Fenske V300 (izquierda) y Viscosímetro V400 (derecha).

Se prepararon 25 g de cada tipo de disolución polimérica control y se procedió a medir sus viscosidades. Para ello, se colocó el viscosímetro en un baño a 40 °C y se rellenó, con la respectiva disolución polimérica control, el reservorio (A) del viscosímetro hasta la mitad a través del capilar colocado arriba de este. Seguidamente, se absorbió la disolución con la ayuda de una pera de succión por el otro capilar hasta que alcanzó la bola situada encima de la línea "B". A continuación, se calculó el tiempo que tardaba la disolución en pasar desde la línea "B" hasta la línea "C". Esta medición se hizo por triplicado y se repitió cada siete días durante 3 semanas para cada tipo de disolución polimérica

control.

Una vez obtenidas las medidas para cada disolución polimérica control, se calcularon las viscosidades en centipoises (cPs) completando la siguiente fórmula, donde “K” es la constante del viscosímetro, “t” el tiempo cronometrado en segundos y “D” la densidad de la disolución polimérica.

La densidad de cada disolución se calculó pesando los gramos de esta en un matraz aforado de 5 ml.

$$\text{Viscosidad absoluta (Centipoises)} = K \cdot t \cdot D$$

3.5. PREPARACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Las nanofibras poliméricas se elaboraron con sus respectivas condiciones experimentales, según el polímero y el tipo de retinoide incorporado, empleando la técnica de electrohilatura. Todas se prepararon con unas condiciones de humedad ambiental entre 45-55 % y una temperatura entre 20-25 °C.

Las muestras de nanofibras se realizaron sobre un portaobjetos para ser analizadas mediante microscopía óptica, o sobre un portaobjetos recubierto de papel de aluminio para ser analizadas mediante microscopía electrónica. Para los ensayos de liberación mediante celdas de Franz, algunas muestras de nanofibras se prepararon sobre parches transdérmicos.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

3.6.1. Microscopio óptico

Se utilizó un microscopio LEICA DMI 3000B, equipado con una cámara digital Leica DMI 3000B y una fuente de luz compacta EL6000 para observar las nanofibras resultantes del proceso de electrohilado.

Esta metodología es la ideal para optimizar el proceso de *electrospinning* en las etapas iniciales de caracterización de las fibras. Con este microscopio se pueden observar las fibras de una forma rápida y sencilla, así como estudiar algunas propiedades importantes de estas, como son el grosor, la linealidad, la morfología, la uniformidad y la firmeza con el objetivo de poder analizar la calidad, la homogeneidad y la presencia de defectos en las fibras rápidamente.

No obstante, el grosor no se puede medir con plena precisión, debido a que el borde borroso de las fibras observado en las imágenes, junto con la resolución de la cámara y el máximo aumento del microscopio, no permiten delimitar el borde de estas de forma exacta.

3.6.2. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)

Se empleó un microscopio electrónico de barrido Schottky de cátodo caliente, modelo de emisión Sigma 300VP para caracterizar las fibras de una forma más precisa. Se trata de un microscopio de barrido con pistola de emisión de campo (FESEM).

Gracias a la gran resolución de este microscopio es posible analizar con una mayor precisión todas las propiedades con respecto a la morfología de las fibras. Sin embargo, en ocasiones la determinación cuantitativa de algunos grosores de las fibras resulta complicada, por lo que estas cifras deben ir acompañadas de un margen de error.

3.7. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

3.7.1. Disoluciones poliméricas

La estabilidad en el tiempo de los retinoides en los diferentes tipos de disoluciones poliméricas se estudió midiendo la absorbancia de estas disoluciones a través de un espectrofotómetro UV-Vis, explicado en el apartado 3.2.1 de este trabajo (espectrofotómetro UV-Vis).

Las disoluciones poliméricas se elaboraron siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3 (preparación de las disoluciones poliméricas). Una vez realizadas, se guardaron a temperatura ambiente tapadas de la luz, excepto 3 g de disolución que se extrajeron de cada una de ellas para guardarlas en el frigorífico a una temperatura de 5 °C. A continuación, se recogieron muestras de cada tipo de disolución en las diferentes temperaturas a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas) y se procedió a medir las absorbancias de esas muestras. Las muestras de disolución pesadas contenían una cantidad teórica de retinoide que se encontraba dentro de las curvas de calibrado que se realizaron con anterioridad.

3.7.2. Nanofibras poliméricas

Para estudiar la estabilidad en el tiempo de los retinoides encapsulados en las distintas nanofibras poliméricas, se prepararon las fibras que presentaban los retinoides encapsulados con sus respectivas condiciones experimentales mediante la técnica de *electrospinning*, y se recogieron muestras por duplicado a distintos tiempos (0 horas, 1, 3 y 9 días). Las nanofibras se mantuvieron a temperatura ambiente y tapadas de la luz, excepto en los momentos de recogida de las muestras.

Las muestras de nanofibras tomadas presentaban una cantidad teórica de retinoide comprendida dentro del rango de la curva de calibrado realizada con anterioridad. Estas muestras se diluyeron en 1 ml de etanol y se analizaron mediante HPLC.

Para estudiar la eficiencia de encapsulación (EE %) en las nanofibras se cuantificó, mediante la técnica de HPLC, una muestra de la disolución inicial correspondiente diluida en 1 ml de etanol para entrar dentro del rango de la curva de calibrado. Estos valores obtenidos se tenían que tomar como referencia para cuantificar la cantidad de retinoide encapsulado en las nanofibras. Mencionar que las muestras de las disoluciones iniciales y de las nanofibras se mantuvieron en el congelador (-22 °C) hasta el momento de ser analizadas mediante HPLC.

3.8. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO* MEDIANTE CELDAS DE FRANZ

Se realizaron dos ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz para estudiar la cinética de liberación de los retinoides encapsulados en las nanofibras poliméricas. En ambos ensayos se emplearon nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p con los principios activos.

En el primer ensayo preliminar, se colocó en el compartimento donador directamente sobre la membrana las siguientes muestras en sus respectivas celdas: Nanofibras con acitretina, nanofibras con isotretinoína, un parche transdérmico con nanofibras de acitretina, un parche transdérmico con nanofibras de isotretinoína, un control positivo de acitretina y un control positivo de isotretinoína. Tras iniciar el ensayo, se tomaron volúmenes de muestras (300 µl) a diferentes tiempos (1, 2, 3, 5, 8, 24, 48 y 72 horas) reponiendo siempre con solución tampón el mismo volumen extraído en cada celda. Estas muestras se analizaron mediante la técnica analítica HPLC, descrita anteriormente, para obtener la concentración de retinoide que se iba liberando en el compartimento receptor. Mencionar que los controles positivos de los retinoides consistieron en disolver una cantidad conocida de estos en etanol.

El segundo experimento se realizó del mismo modo, las únicas diferencias con respecto al primer experimento es que las muestras sólo se recogieron a las 48 horas y se analizaron mediante espectrofotometría UV-Vis. Para analizar las muestras mediante esta técnica se añadió a los 5 ml recogidos del compartimento receptor de cada celda, otros 5 ml de etanol en el caso de las muestras con isotretinoína, y 5 ml de THF para las muestras que contenían acitretina. Seguidamente, se midió las absorbancias de estas muestras.

Antes de realizar estos experimentos, se realizó una prueba piloto para decidir qué disolvente era más adecuado colocar en el compartimento receptor. Se estudió diversas bibliografías y se realizaron pruebas con PBS, etanol:PBS (1:1) y etanol:PBS (3:7) [54] [55]. Tras analizar las muestras mediante HPLC, se decidió emplear como disolvente el PBS.

3.9. ENSAYOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

3.9.1. Cultivos celulares

En los ensayos biológicos *in vitro* se empleó una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) proporcionados por el Dr. Antonio Ferrer. Estas células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en un medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 50 µg/ml de gentamicina (todo procedente de la casa comercial Sigma-Aldrich).

3.9.2. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

Este tipo de ensayo se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) mediante la acción de una enzima mitocondrial denominada succinato-deshidrogenasa, la cual se encuentra en las mitocondrias de las células vivas. El MTT es un compuesto soluble en agua y de color amarillo, pero cuando se reduce a formazán se vuelve insoluble en agua y de color violeta. En el momento en el que el MTT reducido se disuelve en un disolvente orgánico como el DMSO (dimetilsulfóxido), es posible cuantificar por colorimetría su cantidad y de este modo evaluar la viabilidad celular.

Para realizar este ensayo, células sembradas el día anterior en placas de 96 pocillos fueron tratadas durante 48 horas (100 µl/pocillo) a una confluencia del 40-50 % con un rango de concentraciones seriadas (0,08-10 µM) por duplicado de cada tipo de nanofibra de PMVEMA-ES/Ac con los principios activos, y diferentes controles (etanol, nanofibras de PMVEMA-ES/Ac sin encapsular y acitretina e isotretinoína disueltas en etanol). A continuación, los tratamientos se reemplazaron por medio de cultivo celular (100 µl) con 0,5 mg/ml de MTT y a las 2 horas, se retiró este medio y se añadieron 100 µl de DMSO para disolver el formazán generado. La absorbancia a 570 nm y a 620 nm se midió con un lector de microplacas Omega SPECTROstar® (BMG LABTECH, Alemania). La diferencia de absorbancia entre 570 y 620 nm se correlacionó directamente con la cantidad de células vivas en cada tratamiento, expresándola en porcentajes con respecto al grupo control (células sin tratar).

3.9.3. Ensayo de proliferación celular mediante tinción con cristal violeta

El ensayo mediante tinción con cristal violeta se realizó para determinar mediante otro método los cambios en el número de células tras tratarlas con las diferentes muestras de nanofibras y de retinoides diluidos en etanol. Este colorante tiñe la membrana de todas las células, indicándonos la cantidad total de células por pocillo.

Para realizar este ensayo se siguió el mismo procedimiento de cultivo celular y tratamiento de las células del apartado anterior. Tras tratar las células con las diferentes muestras durante 48 horas

se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 30 minutos con 100 μ l/pocillo de 1 mg/ml de cristal violeta en una disolución de formalina al 4 % en PBS. Seguidamente, se retiró la tinción, las células se lavaron con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante y se añadió 100 μ l/pocillo de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M para disolver el colorante fijado. Por último, la absorbancia a 620 nm fue determinada con un lector de microplacas Omega SPECTROstar® (BMG LABTECH, Alemania) y los datos obtenidos expresados en porcentaje de absorbancia a 620 nm respecto al grupo control (células sin tratar).

4. RESULTADOS

4.1. VISCOSIDAD DE LAS DISOLUCIONES POLIMÉRICAS

La viscosidad de los tres tipos de disolución polimérica control (PMVEMA-ES 25 % p/p, PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p y PMVEMA-Ac 15 % p/p) se midió tal y como se indica en el apartado 3.4 de este trabajo (viscosidad de las disoluciones poliméricas). La viscosidad de las disoluciones se midió por triplicado una vez por semana durante 4 semanas (1, 8, 15 y 22 días) y se obtuvieron los resultados en valores de centipoises. En la siguiente figura (Figura 11) se muestra la variación de la viscosidad de las distintas disoluciones poliméricas control conforme pasa el tiempo.

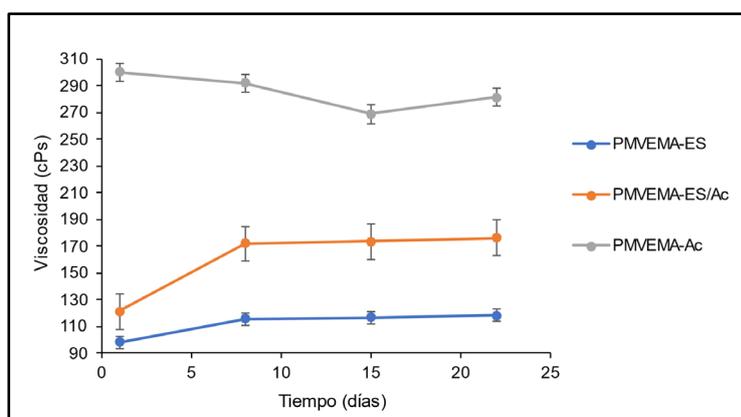


Figura 11: Variación de la viscosidad con respecto al tiempo de las disoluciones poliméricas control de PMVEMA-ES 25 % p/p, PMVEMA-Ac 15 % p/p y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p. Los valores están representados en centipoises (cPs) y cada valor representa la media de tres medidas \pm desviación estándar (n=3).

4.2. PREPARACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Las nanofibras se prepararon tal y como se describe en el apartado 3.5 de este trabajo (preparación de las nanofibras poliméricas). Haciendo uso de la microscopía óptica se optimizó los parámetros experimentales para cada tipo de nanofibra polimérica, los cuales se encuentran resumidos en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2: Condiciones experimentales óptimas empleadas para cada tipo de nanofibra polimérica.

Disolución polimérica	Nanofibra	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Flujo (ml/h)
PMVEMA-ES 25 % p/p	Control	16	14	0,25
	Acitretina	16	14	0,25
	Isotretinoína	18	16	0,25
PMVEMA-Ac 15 % p/p	Control	16	20	0,25
	Acitretina	16	20	0,25
	Isotretinoína	16	20	0,25
PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p	Control	18	14	0,25
	Acitretina	18	14	0,25
	Isotretinoína	18	14	0,25

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

4.3.1. Microscopio óptico

Todos los tipos de nanofibras poliméricas se elaboraron mediante la técnica de electrohilatura con sus respectivas condiciones experimentales y fueron caracterizadas cualitativamente con la ayuda de un microscopio óptico. Los parámetros escogidos para cada una de las nanofibras (recogidos en la Tabla 2) se seleccionaron debido a que, tras varias pruebas de modificación, se observó que con esas condiciones experimentales las fibras resultantes no presentaban gotas o imperfecciones (Figura 12).

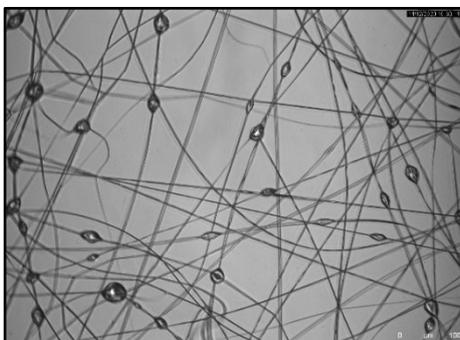


Figura 12: Presencia de gotas en nanofibras control de PMVEMA-ES 25 % p/p.

En la siguiente figura (Figura 13) se muestran las imágenes a microscopía óptica tomadas a distintos aumentos, de los tres tipos de nanofibras poliméricas de PMVEMA-ES 25 % p/p optimizadas en diferentes condiciones experimentales, las cuales se encuentran recogidas en la Tabla 2.

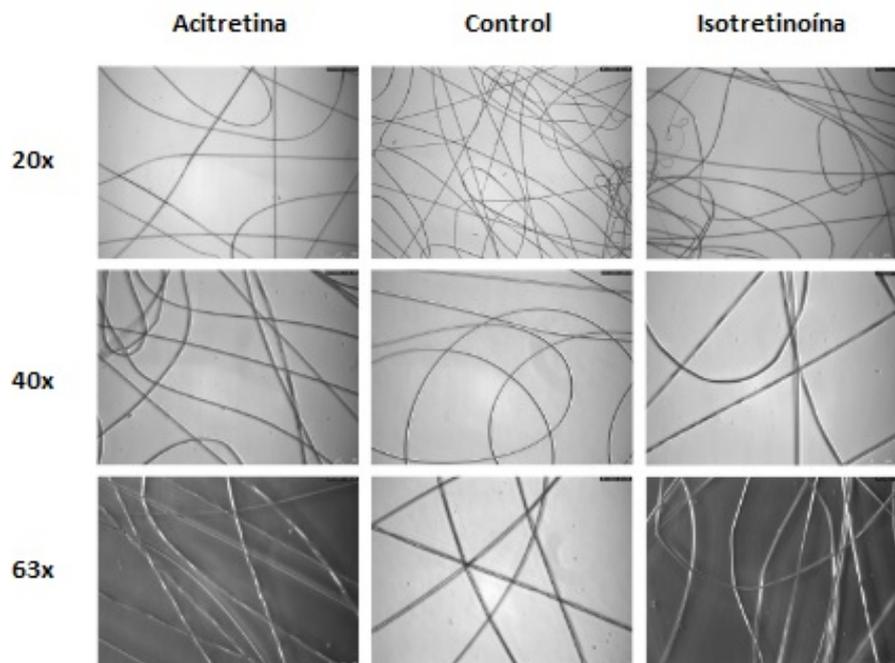


Figura 13: Imágenes de microscopía óptica en diferentes aumentos (20x, 40x y 63x) de las distintas nanofibras de PMVEMA-ES: Nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p control, nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05% de acitretina y nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05% de isotretinoína.

A continuación, se muestra en las siguientes figuras (Figura 14 y Figura 15), las imágenes tomadas a microscopía óptica de los tres tipos de nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac 15 % p/p y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p, respectivamente. Los tres tipos de nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac 15 % p/p se optimizaron con las mismas condiciones experimentales, y lo mismo ocurrió con las condiciones experimentales de las nanofibras poliméricas de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p. Los parámetros utilizados se encuentran recogidos en la Tabla 2.

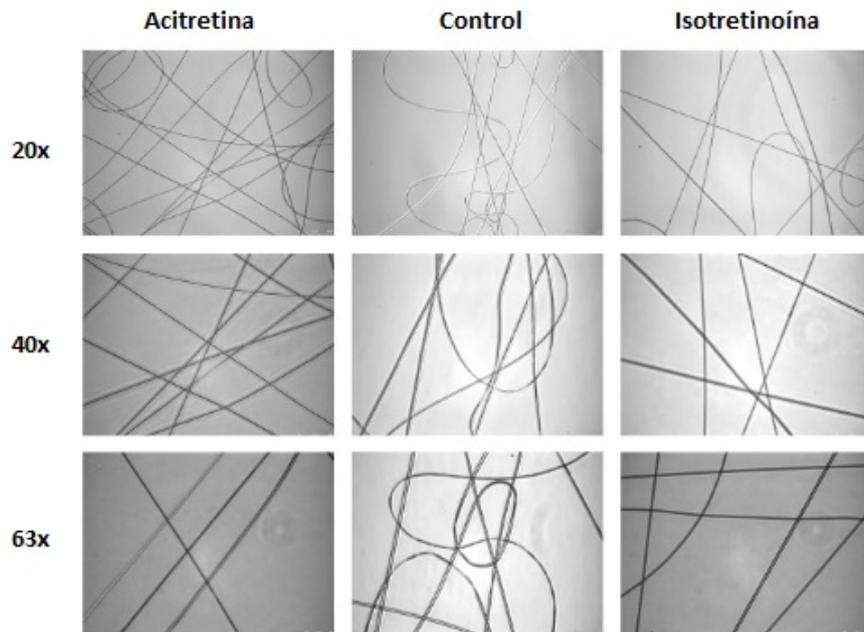


Figura 14: Imágenes de microscopía óptica en distintos aumentos (20x, 40x y 63x) de las diferentes nanofibras de PMVEMA-Ac: Nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p control, nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de acitretina y nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de isotretinoína.

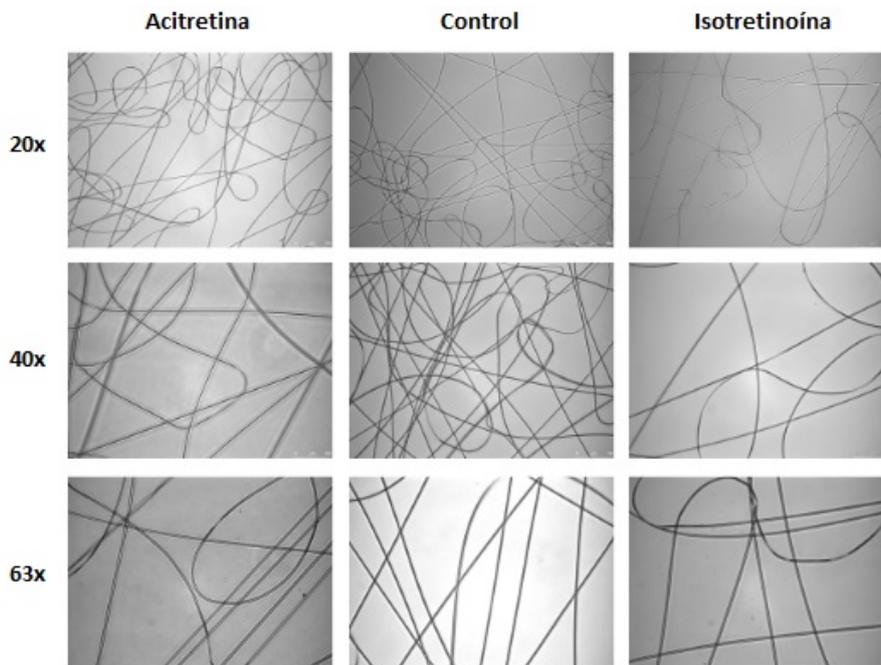


Figura 15: Imágenes de microscopía óptica a diferentes aumentos (20x, 40x y 63x) de las distintas nanofibras poliméricas de PMVEMA-ES/Ac: Nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p control, nanofibras de PMVEMA-ES/Ac con 0,05 % de acitretina y nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % con 0,05 % de isotretinoína.

4.3.2. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)

Gracias al uso de este microscopio electrónico se realizó una caracterización cuantitativa de las nanofibras tras optimizarlas en el proceso de electrohilado. Las imágenes obtenidas con este equipo permiten observar con detalle la morfología de los distintos tipos de nanofibras poliméricas, tanto con el principio activo incorporado como sin él.

Se muestra a continuación las imágenes a microscopía electrónica obtenidas de las distintas nanofibras realizadas con PMVEMA-ES 25 % p/p (Figura 16), PMVEMA-Ac 15 % p/p (Figura 17) y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p (Figura 18).

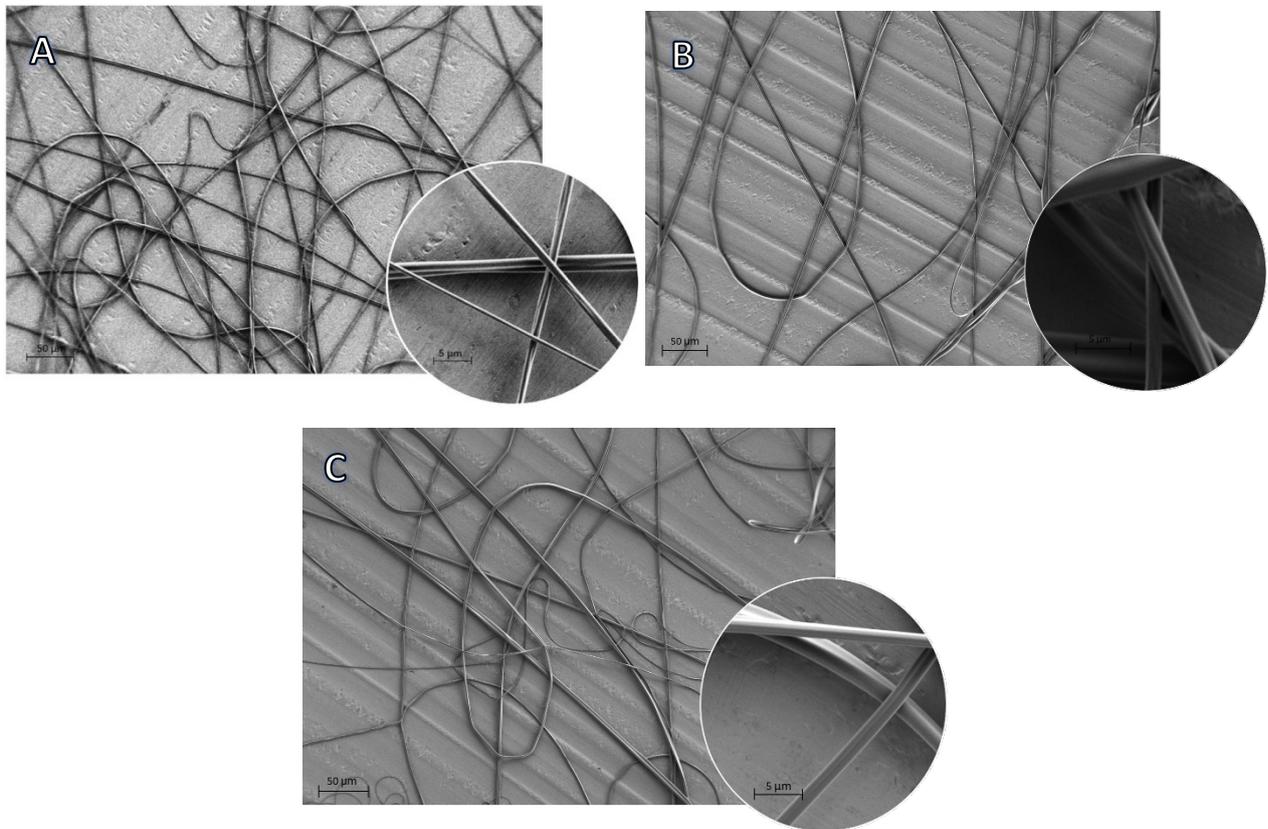


Figura 16: Imágenes de microscopía electrónica en diferentes escalas (50 μm y 5 μm) de las distintas nanofibras realizadas con PMVEMA-ES. **A.** Nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p control. **B.** Nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05 % de acitretina. **C.** Nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05 % de isotretinoína.

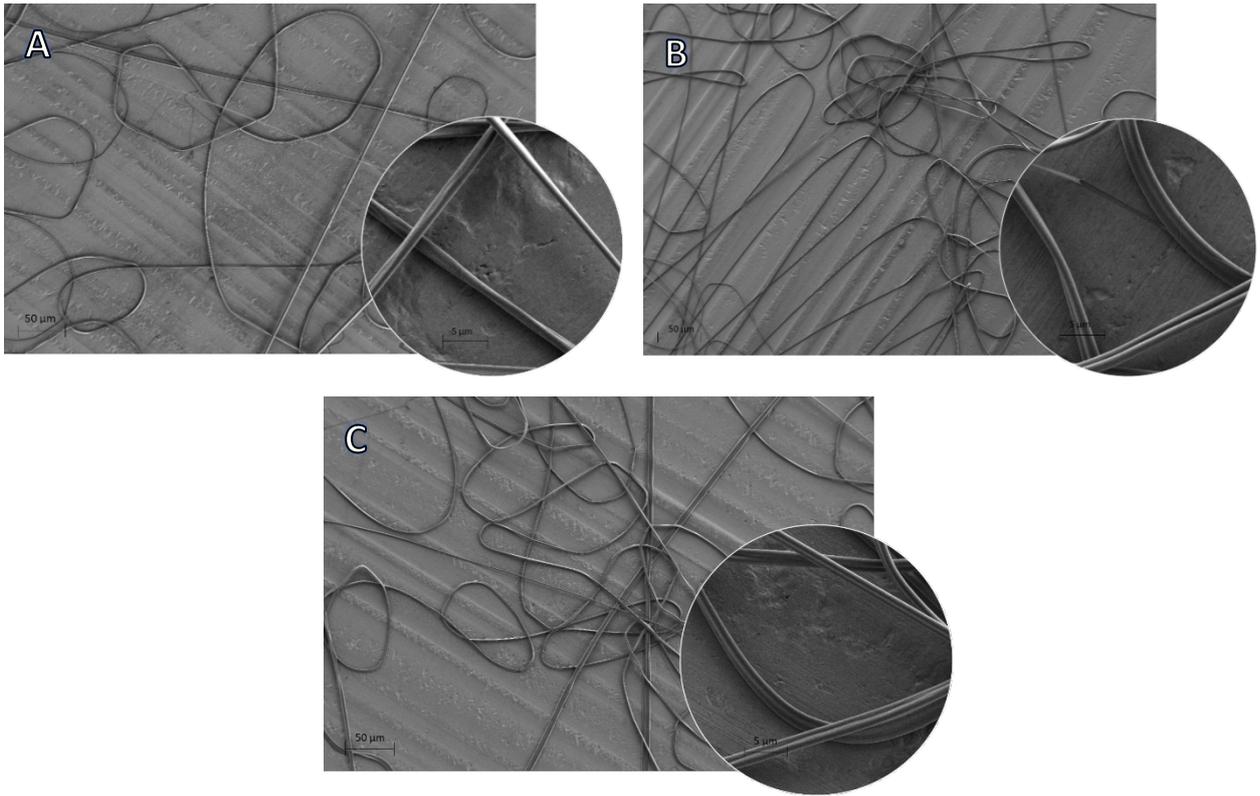


Figura 17: Imágenes de microscopía electrónica en diferentes escalas (50 µm y 5 µm) de las distintas nanofibras realizadas con PMVEMA-Ac. **A.** Nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p control. **B.** Nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de acitretina. **C.** Nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de isotretinoína.

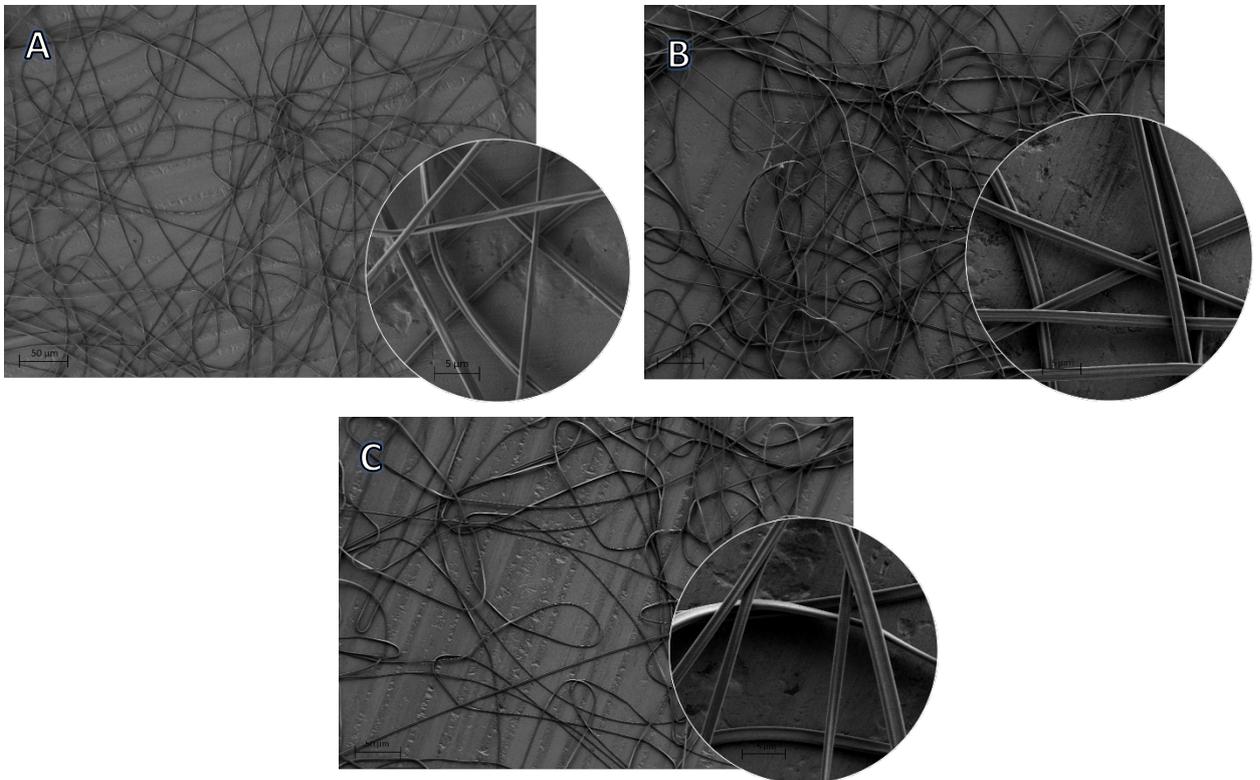


Figura 18: Imágenes de microscopía electrónica en diferentes escalas (50 µm y 5 µm) de las distintas nanofibras realizadas con PMVEMA-ES/Ac. **A.** Nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p control. **B.** Nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p con 0,05 % de acitretina. **C.** Nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p con 0,05 % de isotretinoína.

Con estas imágenes tomadas con el microscopio electrónico (FESEM), los bordes de las fibras se distinguen con mayor nitidez, lo que permite realizar las medidas del grosor de las fibras de una forma más exacta. Por tanto, se realizaron 100 mediciones del diámetro de cada tipo de nanofibra realizadas con las distintas disoluciones poliméricas, haciendo uso del programa informático denominado "ImageJ". Con estas medidas se realizaron histogramas para observar la distribución del tamaño de las distintas nanofibras poliméricas.

A continuación, se muestran los histogramas creados para los distintos tipos de nanofibras realizadas con las disoluciones de PMVEMA-ES 25 % p/p (Figura 19), PMVEMA-Ac 15 % p/p (Figura 20) y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p (Figura 21), y la media de los grosores de cada tipo de nanofibra polimérica (Tabla 3).

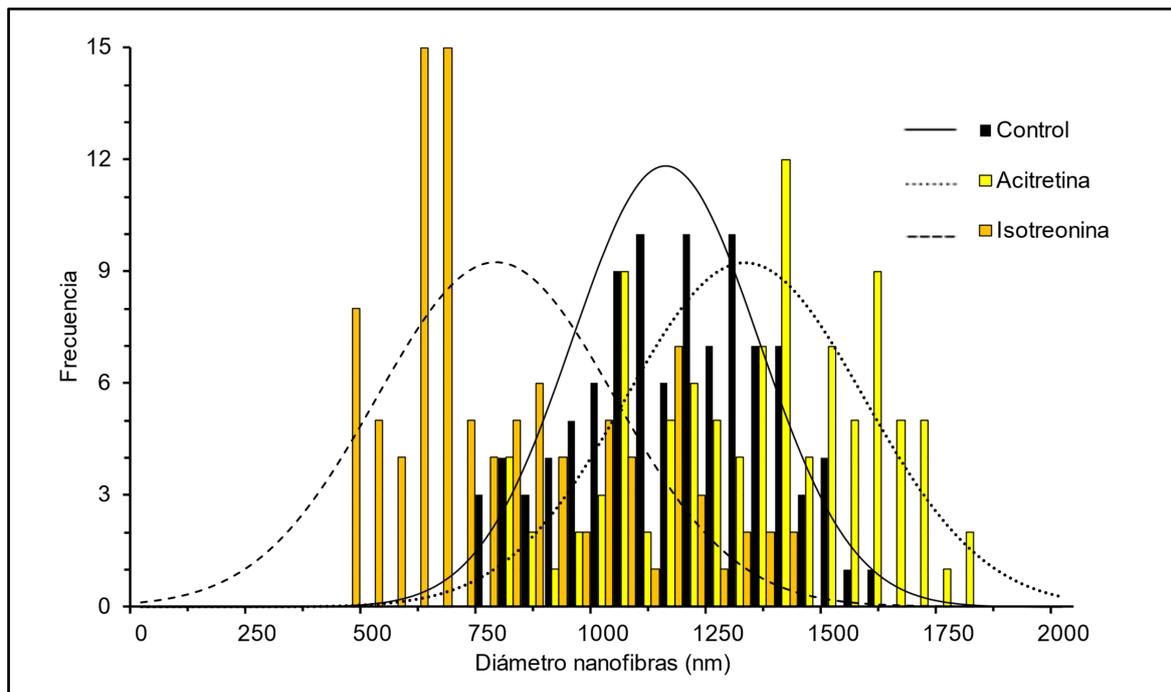


Figura 19: Histograma de la distribución de los grosores de las distintas nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p según la presencia o ausencia del principio activo encapsulado (n=100).

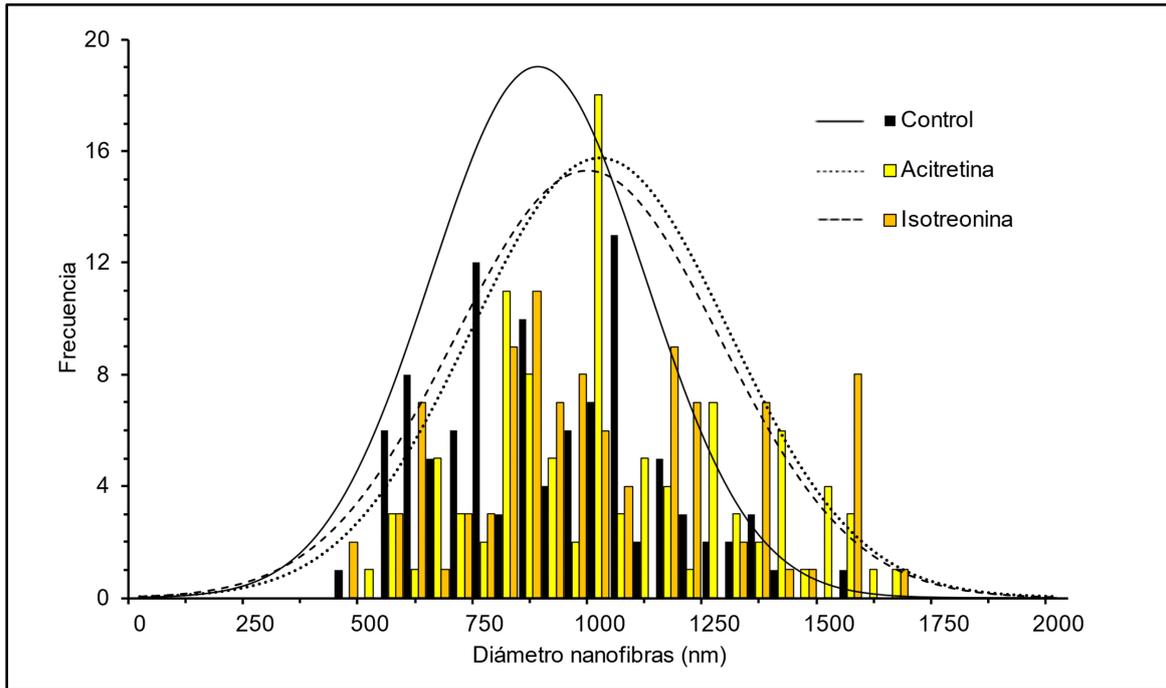


Figura 20: Histograma de la distribución de los grosores de las distintas nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p según la presencia o ausencia del principio activo encapsulado (n=100).

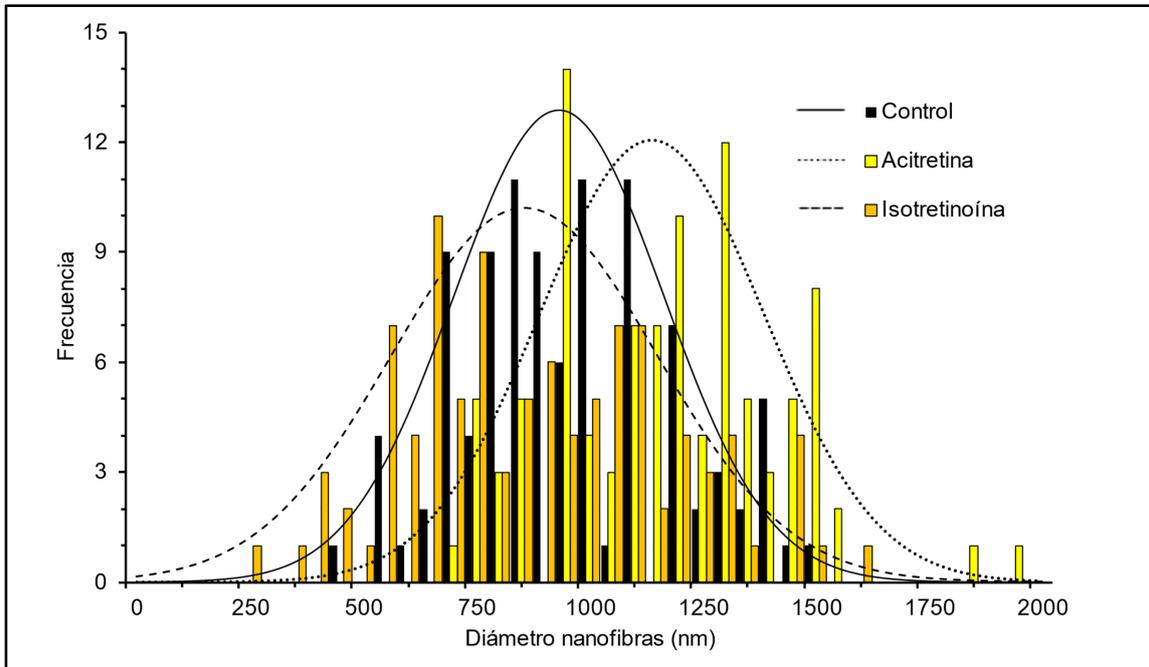


Figura 21: Histograma de la distribución de los grosores de las distintas nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p según la presencia o ausencia del principio activo encapsulado (n=100).

Tabla 3: Media de los grosores de cada tipo de nanofibra polimérica.

Disolución polimérica	Nanofibra	Diámetros (nm)*
PMVEMA-ES 25 % p/p	Control	1138 ± 202
	Acitretina	1311 ± 259
	Isotretinoína	771 ± 258
PMVEMA-Ac 15 % p/p	Control	868 ± 233
	Acitretina	1004 ± 281
	Isotretinoína	976 ± 289
PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p	Control	933 ± 232
	Acitretina	1139 ± 248
	Isotretinoína	857 ± 293

*Media aritmética ± desviación estándar de las 100 medidas de los diámetros de cada tipo de nanofibra.

4.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

4.4.1. Rectas de calibrado

A continuación, se muestran las rectas de calibrado realizadas para ambos retinoides en el espectrofotómetro UV-Vis (Figura 22) y en el HPLC (Figura 23). Cada punto de las rectas corresponde a la media de dos medidas necesarias para cuantificar los principios activos.

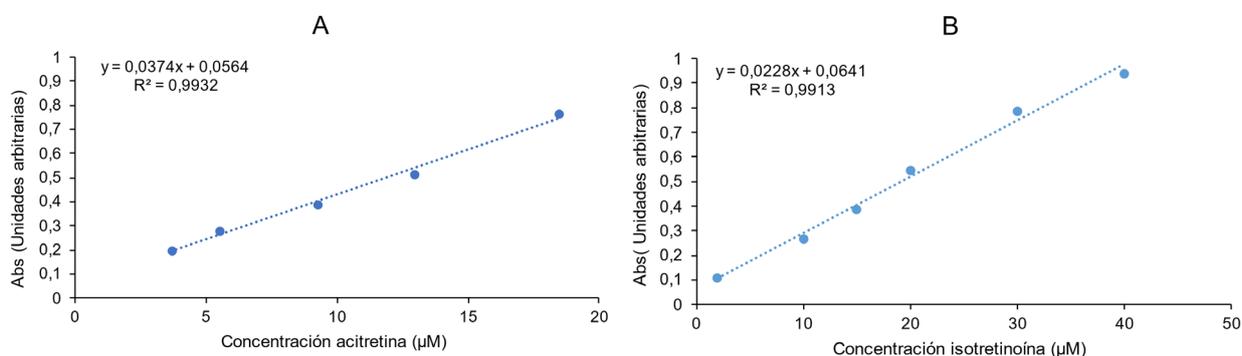


Figura 22: Rectas de calibrado de los retinoides realizadas en el espectrofotómetro UV-Vis. **A.** Recta de calibrado de la acitretina. **B.** Recta de calibrado de la isotretinoína. (n=2)

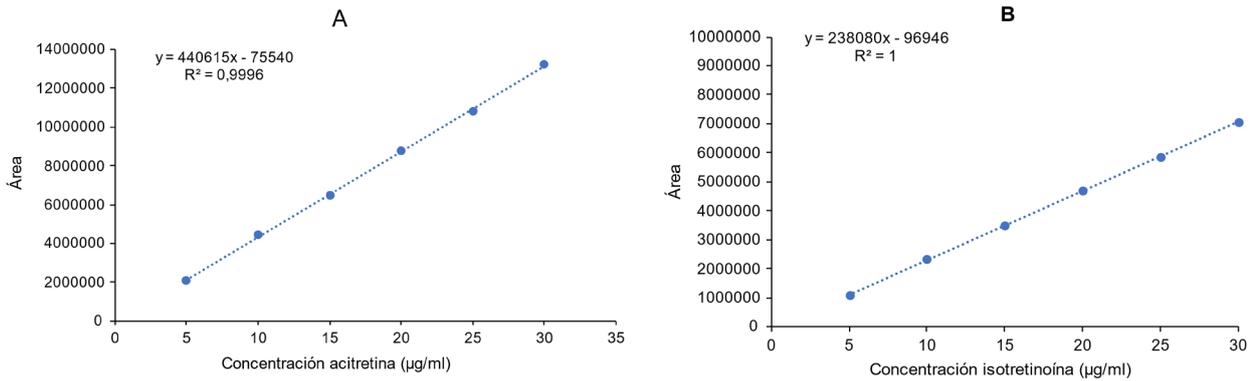


Figura 23: Rectas de calibrado de los retinoides realizadas en el HPLC. **A.** Recta de calibrado de la acitretina. **B.** Recta de calibrado de la isotretinoína. (n=2)

4.4.2. Disoluciones poliméricas

Con un espectrofotómetro UV-Vis se midieron las absorbancias de las muestras recogidas de las distintas disoluciones poliméricas a distintas temperaturas y en diferentes tiempos, y con la ecuación de la recta de las curvas de calibrado realizadas con anterioridad, se obtuvo la cantidad teórica de cada retinoide que presentaban las disoluciones poliméricas. Los resultados de las distintas disoluciones con acitretina se muestran en la Figura 24, y los resultados de las distintas disoluciones con isotretinoína se muestran en la Figura 25. En ambas figuras se puede observar que los retinoides se mantuvieron estables en el tiempo en las diferentes disoluciones poliméricas.

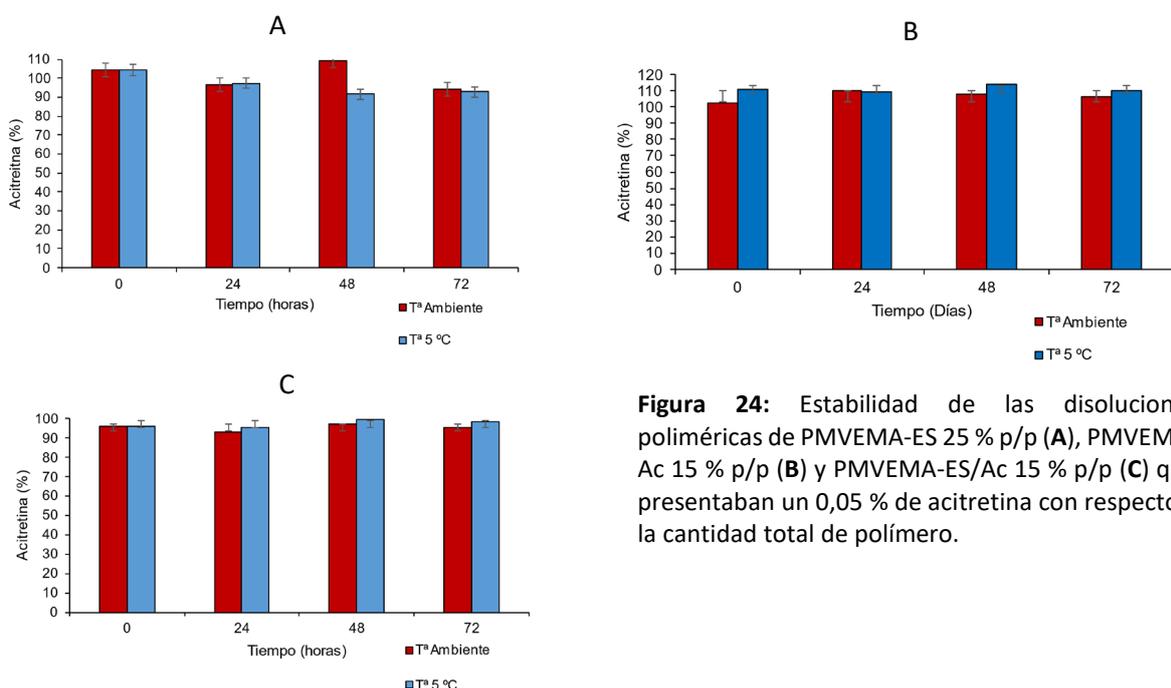


Figura 24: Estabilidad de las disoluciones poliméricas de PMVEMA-ES 25 % p/p (**A**), PMVEMA-Ac 15 % p/p (**B**) y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p (**C**) que presentaban un 0,05 % de acitretina con respecto a la cantidad total de polímero.

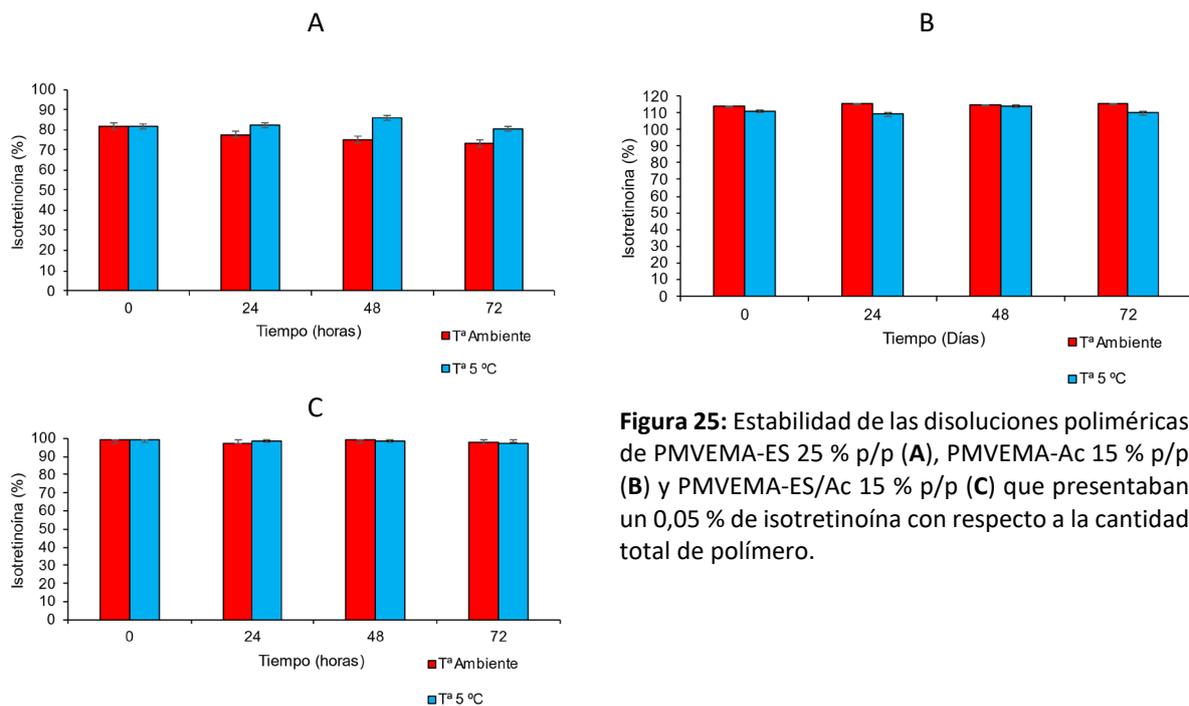


Figura 25: Estabilidad de las disoluciones poliméricas de PMVEMA-ES 25 % p/p (A), PMVEMA-Ac 15 % p/p (B) y PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p (C) que presentaban un 0,05 % de isotretinoína con respecto a la cantidad total de polímero.

A partir de las absorbancias de las anteriores disoluciones, se pudo visualizar los espectros de absorción para ambos retinoides, acitretina e isotretinoína. A continuación, se muestran sus espectros de absorción en un rango de longitudes de onda comprendido entre 300-400 nm (Figura 26).

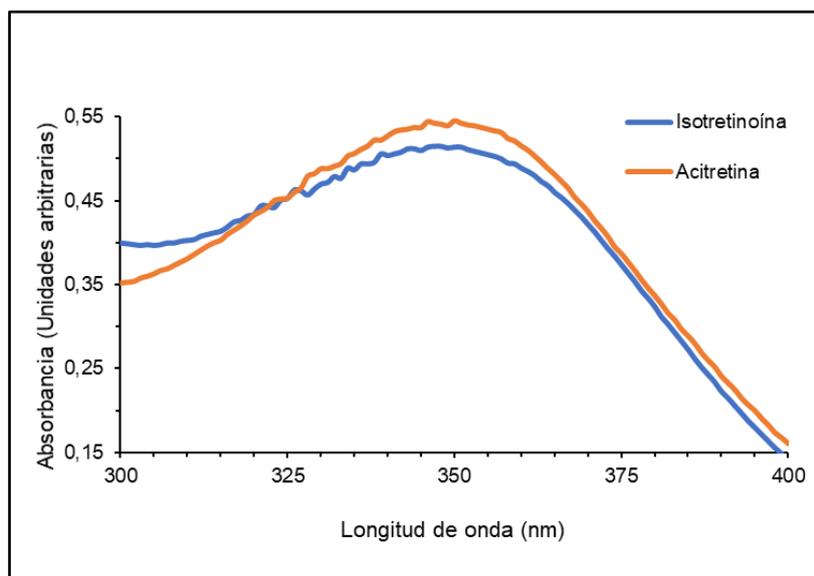


Figura 26: Espectros de absorción de la acitretina y la isotretinoína.

4.4.3. Nanofibras poliméricas

En este ensayo se recogieron muestras por duplicado en distintos tiempos para todos los tipos de nanofibras que presentaban acitretina o isotretinoína encapsulada. Las muestras presentaron una cantidad de fibra entre 20 y 40 mg, cuya cantidad de retinoide correspondería a 10 y 20 µg, respectivamente. Posteriormente estas muestras se analizaron mediante HPLC y con la ecuación de la recta de las curvas de calibrado que se realizaron con anterioridad, se obtuvo la cantidad teórica de cada tipo de retinoide que presentaban esas nanofibras.

En la Figura 27, se muestra un velo de nanofibras de donde se recogieron algunas de las muestras, y en la Figura 28 se muestran los resultados de los ensayos de estabilidad en el tiempo de las nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p y de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p, donde se puede observar la pérdida de principio activo en las nanofibras con respecto al tiempo. Los resultados del ensayo de estabilidad de las nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % no se pudieron obtener debido a una obstrucción en la columna del HPLC que no pudo solucionarse a tiempo. En cuanto a las nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p con 0,05 % de isotretinoína, hubo problemas técnicos con las muestras y no se consiguió analizar los resultados correctamente, por lo tanto, en la Figura 28 A, solo se muestran los resultados de las fibras con acitretina.



Figura 27: Velo de nanofibras de PMVEMA-Ac 15 % p/p con 0,05 % de acitretina.

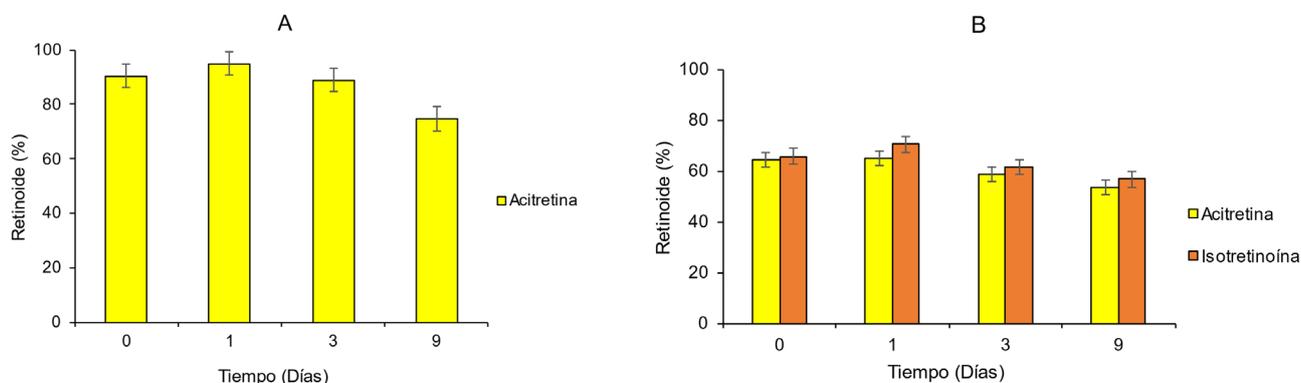


Figura 28: Ensayos de estabilidad en el tiempo de las diferentes nanofibras encapsuladas. **A.** Nanofibras de PMVEMA-ES 25 % p/p. **B.** Nanofibras de PMVEMA-ES/Ac 15 % p/p. Cada valor representa la media de dos valores \pm desviación estándar (n=2).

En las fibras de PMVEMA-ES la EE % de la acitretina fue un 90 %. Sin embargo, en las fibras de PMVEMA-Ac la EE % de la acitretina fue de 64 % y la EE % de la isotretinoína fue de 66 %.

Los datos de la EE % se calcularon tomando como referencia la cantidad de retinoide que debía presentar la nanofibra según la cantidad añadida de estos compuestos en las disoluciones, debido a que por una mala conservación de las muestras de las disoluciones no se pudo cuantificar la EE % tomando como referencia los valores obtenidos en esas muestras.

4.5. ENSAYO DE LIBERACIÓN *IN VITRO* MEDIANTE CELDAS DE FRANZ

En los dos ensayos de liberación *in vitro* que se realizaron con las celdas de Franz, se colocaron muestras de nanofibras comprendidas entre los 13-50 mg, las cuales presentaban una cantidad teórica de retinoide comprendida entre 6,5-25 μ g, respectivamente. En la Figura 29 se muestran los pesos de las distintas muestras de fibras que se depositaron en cada celda en ambos ensayos, así como la cantidad teórica de retinoide que debían contener esas fibras.

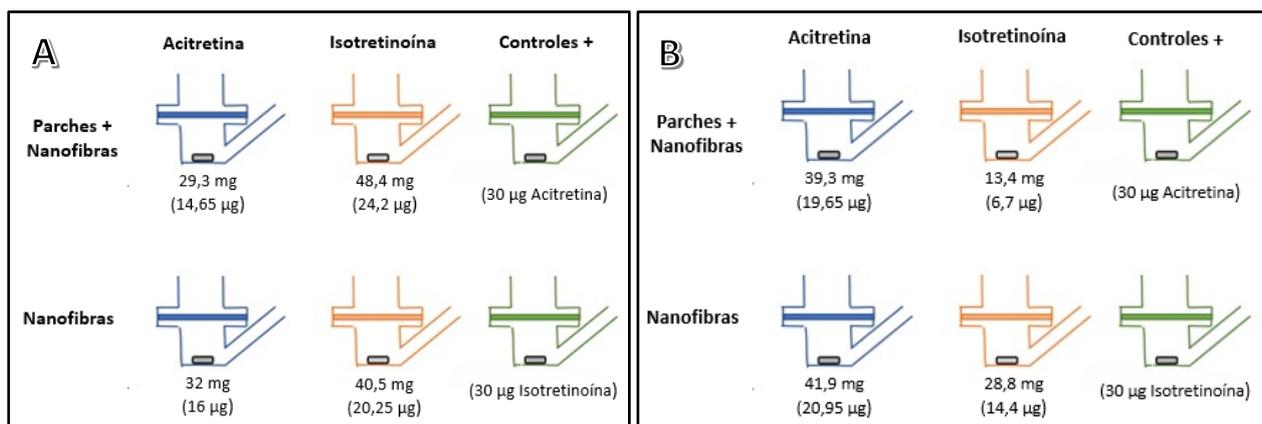


Figura 29: Pesos de las muestras de fibras (mg) que se depositaron en cada celda de Franz con sus respectivas cantidades de principio activo encapsulado (μ g), en los ensayos 1 (A) y 2 (B). Los controles no presentaron parches ni fibras, consistieron en depositar esa cantidad de retinoide diluida en etanol encima de la membrana.

Las muestras recogidas en el primer ensayo preliminar se analizaron mediante HPLC. Sin embargo, tras analizar los resultados se observó que no se produjo ninguna liberación de los retinoides en el compartimento receptor a lo largo del tiempo.

En cuanto a los resultados del segundo ensayo, las muestras se analizaron mediante un espectrofotómetro UV-Vis y se determinó, mediante la absorbancia de estas muestras y las rectas de calibrado realizadas para cada retinoide, la cantidad de principio activo que había atravesado la membrana hacia el compartimento donador. En la Tabla 4 se muestra la cantidad de principio activo

(μg) que se depositó junto con las fibras encima de la membrana en el compartimento donador, y el porcentaje de esa cantidad de principio activo (%) que difundió hacia el compartimento receptor.

Tabla 4: Resultados del porcentaje (%) de principio activo que atravesó la membrana en el segundo ensayo de liberación mediante celdas de Franz.

Celda	Retinoide (μg)	Retinoide (%)
Control acitretina	30	2,85
Parque nanofibras acitretina	19,65	11,10
Nanofibras acitretina	20,95	2,97
Control Isotretinoína	30	7,90
Parque nanofibras isotretinoína	6,7	11,79
Nanofibras isotretinoína	14,4	10,97

4.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Se muestra en las siguientes figuras los resultados del ensayo de viabilidad celular realizado con MTT (Figura 30) y los resultados del ensayo de proliferación celular realizado con tinción con cristal violeta (Figura 31) en la línea celular HaCaT. En los ensayos de viabilidad celular, se observó una mayor mortalidad en aquellas células que se incubaron con las muestras de nanofibras, y una mayor mortalidad conforme se aumentaba la concentración de retinoide en todas las muestras. En cuanto a los ensayos de proliferación celular, no se observaron variaciones significativas en el número de células tras incubarlo con las diferentes muestras.

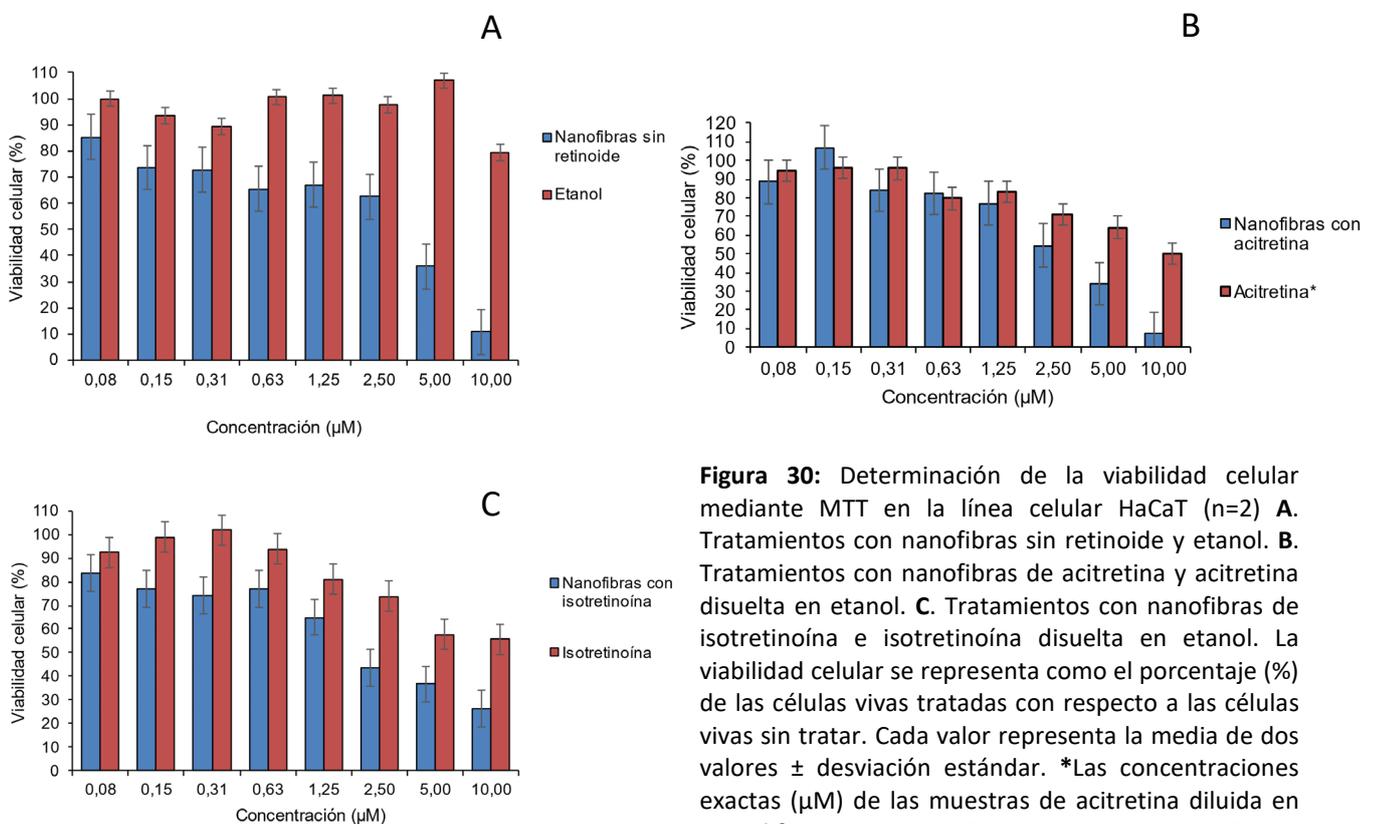


Figura 30: Determinación de la viabilidad celular mediante MTT en la línea celular HaCaT (n=2) **A.** Tratamientos con nanofibras sin retinoide y etanol. **B.** Tratamientos con nanofibras de acitretina y acitretina disuelta en etanol. **C.** Tratamientos con nanofibras de isotretinoína e isotretinoína disuelta en etanol. La viabilidad celular se representa como el porcentaje (%) de las células vivas tratadas con respecto a las células vivas sin tratar. Cada valor representa la media de dos valores \pm desviación estándar. *Las concentraciones exactas (μM) de las muestras de acitretina diluida en etanol fueron: 0,09 - 0,18 - 0,36 - 0,72 - 1,45 - 2,9 - 5 - 10.

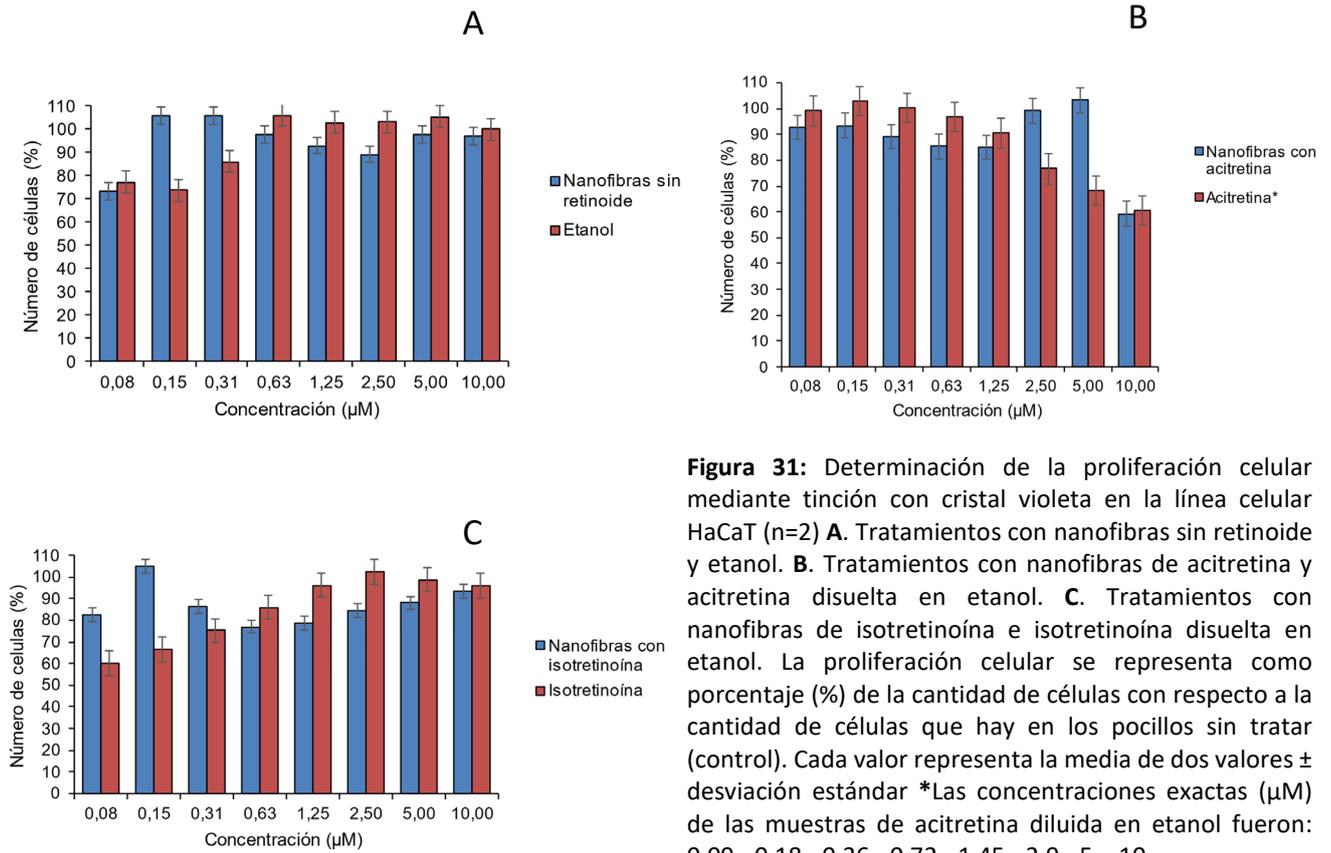


Figura 31: Determinación de la proliferación celular mediante tinción con cristal violeta en la línea celular HaCaT (n=2) **A.** Tratamientos con nanofibras sin retinoide y etanol. **B.** Tratamientos con nanofibras de acitretina y acitretina disuelta en etanol. **C.** Tratamientos con nanofibras de isotretinoína e isotretinoína disuelta en etanol. La proliferación celular se representa como porcentaje (%) de la cantidad de células con respecto a la cantidad de células que hay en los pocillos sin tratar (control). Cada valor representa la media de dos valores \pm desviación estándar *Las concentraciones exactas (μM) de las muestras de acitretina diluida en etanol fueron: 0,09 - 0,18 - 0,36 - 0,72 - 1,45 - 2,9 - 5 - 10.

5. DISCUSIÓN

En este proyecto se eligió el PMVEMA-ES y el PMVEMA-Ac como matrices poliméricas para la elaboración de nanofibras con la finalidad de estudiar las diferencias de tamaño, morfología, encapsulación, estabilidad y liberación de los principios activos (acitretina e isotretinoína). Existen estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio por Mira *et al.* [49] y Martínez-Ortega *et al.* [52] que indican que las nanofibras desarrolladas con PMVEMA-Ac suelen presentar un diámetro menor que las fibras desarrolladas con PMVEMA-ES. Además, en uno de esos estudios [49] se señala que el polímero PMVEMA-Ac da lugar a una liberación más rápida de los principios activos en comparación con el polímero PMVEMA-ES, por tanto, se decidió juntar ambos polímeros con la intención de combinar sus propiedades de liberación.

Se empleó etanol como disolvente principal para elaborar todos los tipos de disoluciones poliméricas debido a que los retinoides usados en este proyecto son insolubles en agua [53] [56] [57]. Además, el producto comercial de PMVEMA-ES que se utilizó para elaborar algunas de las disoluciones ya presentaba un 50 % p/p en etanol, siendo también medianamente insoluble en agua. Normalmente, en nuestro laboratorio las disoluciones de PMVEMA-Ac se preparan en agua como disolvente [50]. Sin embargo, en este proyecto se ha demostrado que este polímero también presenta una buena compatibilidad con el etanol. Por tanto, teniendo en cuenta la solubilidad de los retinoides y de los polímeros, se decidió que el etanol era el disolvente adecuado para elaborar los tres tipos de disoluciones poliméricas (PMVEMA-ES, PMVEMA-ES/Ac y PMVEMA-Ac).

Por su parte, la solubilización de la acitretina resultó bastante complicada debido a que es prácticamente insoluble en la mayoría de los disolventes. Este retinoide es soluble en etanol (siempre y cuando se empleen grandes cantidades de este disolvente) y muy soluble en THF [53], por tanto, se tuvo que emplear pequeñas cantidades de THF para asegurar una correcta solubilización de este retinoide en las disoluciones poliméricas. En algunos estudios se ha informado acerca de la toxicidad del THF [58] y de la irritación que puede causar en la piel las preparaciones que contienen 50 % v/v de alcohol [59], sin embargo, esto no supone un problema debido a que los disolventes se evaporan en el proceso de *electrospinning* a la hora de sintetizar las nanofibras.

En cuanto a la medida de la viscosidad de las distintas disoluciones poliméricas control, en la Figura 11 se puede observar que la viscosidad de las disoluciones control de PMVEMA-ES y PMVEMA-ES/Ac aumenta conforme pasa el tiempo, sobre todo, en los primeros siete días desde la preparación de las disoluciones. Este hecho puede deberse a una parcial evaporación del disolvente (etanol). Sin embargo, la viscosidad de la disolución control de PMVEMA-Ac va disminuyendo a lo largo del tiempo, excepto en la última medición. Esta observación podría deberse probablemente a que se produce una

reacción de esterificación entre el etanol y los grupos funcionales del PMVEMA-Ac que va favoreciendo la solubilización de este polímero en el disolvente. Además, en la gráfica se destaca que conforme se aumenta la proporción del polímero PMVEMA-Ac en las disoluciones, más viscosidad presentan, siendo la disolución menos viscosa la de PMVEMA-ES (a pesar de presentar un 25 % p/p de polímero) seguida de la de PMVEMA-ES/Ac y la de PMVEMA-Ac.

Con respecto al tamaño y la morfología de las nanofibras sintetizadas, se puede apreciar en la Tabla 3 las diferencias entre los distintos tipos de nanofibras. Las nanofibras de PMVEMA-ES resultaron ser las fibras con mayor diámetro (aprox. 1 micra), seguidas de las de PMVEMA-ES/Ac y PMVEMA-Ac, respectivamente. Todas las nanofibras que contenían encapsulada acitretina presentaron un mayor tamaño que sus respectivas nanofibras control, mientras que las nanofibras con isotretinoína encapsulada presentaron un tamaño menor que sus nanofibras control, excepto en el caso de las nanofibras con PMVEMA-Ac.

Estas variaciones de tamaño entre los distintos tipos de nanofibras poliméricas probablemente sean debidos a la presencia del polímero PMVEMA-Ac, que favorece el desarrollo de fibras con diámetros más pequeños, y a la incorporación de los principios activos. En cuanto al aumento de tamaño con respecto a los controles de los tres tipos de nanofibras que llevaban encapsulada acitretina, puede deberse a las fuerzas intermoleculares del anillo aromático del propio compuesto (Figura 2) junto a su baja solubilidad. Estos sucesos favorecen la generación de estructuras ordenadas (*pi-stacking*) que provocan un aumento del grosor de la fibra generando en ocasiones fibras de doble filamento que son imposibles de separar. Por otra parte, la disminución del tamaño con respecto al control de las fibras de PMVEMA-ES con isotretinoína, probablemente se deba a los distintos parámetros operacionales que se emplearon a la hora de sintetizarlas (Tabla 2), ya que resultó imposible repetir exactamente los mismos parámetros que las nanofibras control y las de acitretina. Sin embargo, las nanofibras de PMVEMA-ES/Ac con isotretinoína resultaron poseer un menor tamaño que sus fibras control a pesar de utilizar los mismos parámetros experimentales. No obstante, esta diferencia de tamaño (76 nm) entre las fibras que llevaban encapsulada isotretinoína y las fibras control es muy pequeña, por lo que entraría dentro del rango de error a la hora de medir las nanofibras.

En el estudio de estabilidad temporal por espectroscopía UV-Vis de los retinoides en las disoluciones (Figura 24 y Figura 25), no se observó ningún tipo de degradación significativa, ya que la cantidad de ambos retinoides en todas las disoluciones a lo largo del tiempo se mantuvo estable, aunque existen antecedentes que indican que estos retinoides son sensibles a la luz, al aire y al calor, especialmente en disolución [53]. Esto puede deberse a que estas disoluciones poliméricas son capaces de conservar adecuadamente estos retinoides, al menos el tiempo observado. Si bien, las muestras guardadas en el congelador para realizar la EE % de las nanofibras obtuvieron pérdidas

significativas de principio activo, lo que sugiere que los retinoides no se preservan fácilmente y conviene trabajar con disoluciones recientes. Por este motivo, la EE % de encapsulación se tuvo que calcular con respecto a la cantidad teórica incorporada en las disoluciones poliméricas.

Por su parte, los ensayos de estabilidad en el tiempo de las nanofibras medido por HPLC (Figura 28) mostraron una disminución de la cantidad de principio activo en las nanofibras conforme pasa el tiempo, excepto a las 24 horas, que el porcentaje de principio activo sube con respecto al día anterior. Esto puede ser debido a que a la hora de pesar las muestras a tiempo 0 horas, se pesara también una parte de etanol que todavía no se había evaporado, pesando realmente menos cantidad de fibra de la que se pensaba y obteniendo por tanto unos valores de principio activo más pequeños que los que había en realidad. Si comparamos los resultados obtenidos en los dos tipos de nanofibras poliméricas, se puede apreciar que la EE % de la acitretina es mucho mayor en las nanofibras de PMVEMA-ES (90 %) que en las de PMVEMA-ES/Ac (64 %), lo que sugiere que quizás el polímero PMVEMA-Ac no consigue encapsular correctamente este retinoide. Para confirmar esta hipótesis faltaría realizar el ensayo de estabilidad con las nanofibras de PMVEMA-Ac, que tal y como se ha mencionado anteriormente no pudo llevarse a cabo por un problema de obstrucción en la columna de HPLC. En cuanto a la isotretinoína su EE % en las nanofibras de PMVEMA-ES/Ac fue de un 66 %, sin embargo, no se pudo obtener los resultados de estabilidad de este retinoide en las nanofibras de PMVEMA-ES debido a dificultades técnicas, por lo que no se pueden comparar las EE %.

En cuanto a los estudios de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz, en los resultados del primer ensayo analizados mediante HPLC se observó que estos retinoides encapsulados en estas nanoestructuras no eran capaces de atravesar la membrana, por lo que se decidió realizar un segundo ensayo empleando un espectrofotómetro UV-Vis para analizar las muestras y confirmar los resultados. En este caso sí se detectó una pequeña liberación de estos retinoides en el compartimento receptor de las celdas (Tabla 4). Las muestras que contenían nanofibras con el retinoide encapsulado presentaron una mayor liberación con respecto a los controles, siendo las fibras de isotretinoína las que mayor liberación exhibieron. Aun así, los porcentajes de liberación fueron muy pequeños, lo que confirma el estudio realizado por Liu *et al.* [55] con nanoestructuras de isotretinoína que indica que este retinoide no es capaz de atravesar completamente la piel. Tal y como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, los retinoides poseen una serie de efectos secundarios en el organismo cuando se administran por vía oral, por lo que la acción localizada de sus efectos en la epidermis a través de estas nanoestructuras podría ser beneficioso para tratar de una nueva forma la HS sin que estos compuestos alcancen la circulación sistémica. Cabe mencionar que este tipo de ensayo no se realizó con los demás tipos de nanofibras (PMVEMA-ES/Ac y PMVEMA-Ac) debido a que ya se había demostrado con las

nanofibras de PMVEMA-ES que estos retinoides no eran capaces de atravesar completamente la membrana.

Con respecto a los estudios celulares *in vitro*, en los resultados del ensayo de viabilidad celular mediante MTT (Figura 30) se puede observar una mayor mortalidad conforme se aumentan las concentraciones de las muestras, y una mayor mortalidad en aquellas células que se trataron con nanofibras con respecto a los controles. Esa mayor mortalidad en las células que se trataron con nanofibras probablemente se debe al cambio de pH que se genera cuando se añaden las fibras, acidificando el medio y creando por tanto un ambiente no favorable para las células. Este problema se podría remediar añadiendo una solución tampón como HEPES ((ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico) para amortiguar el pH del medio. No obstante, esta disminución de la viabilidad celular conforme se aumentan las concentraciones de los retinoides concuerda con los estudios realizados por Liwei *et al.* [60] y Shelake *et al.* [61].

Por otra parte, en los resultados del ensayo de proliferación celular mediante tinción con cristal violeta (Figura 31) no se apreciaron cambios significativos en la proliferación, excepto en las células que presentaban muestras de acitretina (Figura 31 B), donde se observó una pequeña disminución de proliferación celular con respecto a los controles (nanofibras sin encapsular y etanol) de aquellas células que se trataron con mayores concentraciones de acitretina disuelta en etanol, y un aumento de la proliferación celular en aquellas células incubadas con concentraciones pequeñas de ambas muestras con acitretina. En este punto, existen diversos estudios donde indican que a densidades de siembras bajas estos retinoides son capaces de aumentar la proliferación celular, mientras que si se incuban con densidades de siembras altas inhiben la proliferación celular [62] [63] [64]. Por tanto, es probable que no se haya producido ningún efecto en la proliferación celular debido a que la densidad de siembra de las células fue entre 40-50 %. Sin embargo, en los estudios realizados por Ran *et al.* [60], Zhang *et al.* [65] y Ding *et al.* [66] sí se observó una disminución de la proliferación celular en distintas líneas celulares, entre las que se incluyen la línea celular HaCaT, cuando se añadían estos retinoides.

Por último, mencionar que se eligieron las nanofibras de PMVEMA-ES/Ac en lugar de las de PMVEMA-ES o PMVEMA-Ac para realizar los estudios biológicos *in vitro*, debido a que eran las únicas que presentaban los dos tipos de polímeros empleados en este proyecto, y solo disponíamos de las placas de células necesarias para realizar estos ensayos una única vez antes de la entrega de este documento.

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA

En este Trabajo Fin de Máster se ha experimentado con sistemas nanoestructurados para encapsular dos tipos de retinoides por separado, acitretina e isotretinoína. El propósito de desarrollar estas formas farmacéuticas es encontrar una nueva forma de manejar la HS mediante un tratamiento tópico local con estos retinoides. Se emplearon los polímeros PMVEMA-ES y PMVEMA-Ac para este fin por ser biodegradables, biocompatibles y presentar propiedades transportadoras.

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- Se han utilizado distintas disoluciones poliméricas de derivados de PMVEMA como polímero matriz para el desarrollo de nanofibras mediante la técnica de *electrospinning* para encapsular acitretina e isotretinoína.
- La morfología, tamaño y calidad de las fibras dependieron del polímero empleado, del tipo de retinoide encapsulado y de los parámetros experimentales, obteniendo las fibras de mayor tamaño con el polímero PMVEMA-ES, y las de menor tamaño con el polímero PMVEMA-Ac. Las nanofibras poliméricas con acitretina son mayores que con isotretinoína, coincidiendo con una mayor eficiencia de encapsulación.
- El contenido de acitretina e isotretinoína encapsulada en las nanofibras disminuye conforme pasa el tiempo, mientras que en disolución no se observa esta variación.
- Los resultados de los ensayos de liberación *in vitro* mediante celdas de Franz realizados con las fibras de PMVEMA-ES, sugieren que estos retinoides no son capaces de atravesar la piel.
- En los ensayos biológicos con la línea celular HaCaT, la viabilidad celular disminuyó al aumentar las concentraciones de las distintas muestras, siendo más pequeña en aquellas células incubadas con nanofibras. Por lo tanto, concentraciones elevadas de estos retinoides resultan citotóxicas para estas células. La proliferación celular *in vitro* en este trabajo se realizó con densidad de siembra intermedia no produciendo un efecto significativo en los resultados estudiados, siendo necesario cambios en las densidades para analizar su efecto.

En futuros estudios, se debería cuantificar la cantidad de retinoide en todas las disoluciones poliméricas para realizar la EE % a partir de estos datos obtenidos, repetir el ensayo de estabilidad de los retinoides en el tiempo con las nanofibras de PMVEMA-ES con isotretinoína y con ambos tipos de nanofibras de PMVEMA-Ac, y medir el pH en disolución acuosa de las nanofibras de PMVEMA-ES/Ac.

Con este último dato se intentaría amortiguar ese pH añadiendo una solución tampón de HEPES y repetir los ensayos biológicos sin que este parámetro afecte a la viabilidad de las células.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Sabat, G. B. E. Jemec, Ł. Matusiak, A. B. Kimball, E. Prens, and K. Wolk, "Hidradenitis suppurativa," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41572-020-0149-1.
- [2] D. M. L. Saunte and G. B. E. Jemec, "Hidradenitis suppurativa: Advances in diagnosis and treatment," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 318, no. 20, pp. 2019–2032, 2017, doi: 10.1001/jama.2017.16691.
- [3] E. Yue Lee, P. Lansang, N. Shear, and J. Yeung, "What is hidradenitis suppurativa?," *Can. Fam. Physician*, vol. 63, pp. 114–120, 2017.
- [4] E. Prens and I. Deckers, "Pathophysiology of hidradenitis suppurativa: An update," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 73, no. 5, pp. S8–S11, 2015, doi: 10.1016/j.jaad.2015.07.045.
- [5] S. M. Seyed Jafari, R. E. Hunger, and C. Schlapbach, "Hidradenitis Suppurativa: Current Understanding of Pathogenic Mechanisms and Suggestion for Treatment Algorithm," *Front. Med.*, vol. 7, no. March, pp. 18–20, 2020, doi: 10.3389/fmed.2020.00068.
- [6] K. Sartorius, L. Emtestam, G. B. E. Jemec, and J. Lapins, "Objective scoring of hidradenitis suppurativa reflecting the role of tobacco smoking and obesity," *Br. J. Dermatol.*, vol. 161, no. 4, pp. 831–839, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09198.x.
- [7] F. Canoui-Poitrine *et al.*, "Identification of three hidradenitis suppurativa phenotypes: Latent class analysis of a cross-sectional study," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 6, pp. 1506–1511, 2013, doi: 10.1038/jid.2012.472.
- [8] R. Ferrerira *et al.*, "Consensus on the treatment of hidradenitis suppurativa – Brazilian Society of Dermatology," *Brazilian Soc. Dermatology*, vol. 94, pp. 7–19, 2019, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198607>.
- [9] C. C. Zouboulis, V. Del Marmol, U. Mrowietz, E. P. Prens, T. Tzellos, and G. B. E. Jemec, "Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa: Criteria for Diagnosis, Severity Assessment, Classification and Disease Evaluation," *Dermatology*, vol. 231, no. 2, pp. 184–190, 2015, doi: 10.1159/000431175.
- [10] A. Alikhan, P. J. Lynch, and D. B. Eisen, "Hidradenitis suppurativa: A comprehensive review," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 60, no. 4, pp. 539–561, 2009, doi: 10.1016/j.jaad.2008.11.911.
- [11] K. R. van Straalen, S. Schneider-Burrus, and E. P. Prens, "Current and future treatment of hidradenitis suppurativa," *Br. J. Dermatol.*, vol. 183, no. 6, pp. e178–e187, 2020, doi: 10.1111/bjd.16768.
- [12] R. S. SAWERS, V. A. RANDALL, and F. J. G. EBLING, "Control of hidradenitis suppurativa in women using combined antiandrogen (cyproterone acetate) and oestrogen therapy," *Br. J. Dermatol.*, vol. 115, no. 3,

- pp. 269–274, 1986, doi: 10.1111/j.1365-2133.1986.tb05741.x.
- [13] B. Viollet, B. Guigas, N. Sanz Garcia, J. Leclerc, M. Foretz, and F. Andreelli, “Cellular and molecular mechanisms of metformin: An overview,” *Clin. Sci.*, vol. 122, no. 6, pp. 253–270, 2012, doi: 10.1042/CS20110386.
- [14] R. Verdolini, N. Clayton, A. Smith, N. Alwash, and B. Mannello, “Metformin for the treatment of hidradenitis suppurativa: A little help along the way,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 27, no. 9, pp. 1101–1108, 2013, doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04668.x.
- [15] J. Boer and M. Nazary, “Long-term results of acitretin therapy for hidradenitis suppurativa. Is acne inversa also a misnomer?,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 164, no. 1, pp. 170–175, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10071.x.
- [16] J. Boer and M. J. P. Van Gemert, “1-s2.0-S019096229970530X-main,” pp. 73–76, 1999.
- [17] G. Jemec, “Hidradenitis Suppurativa,” *new J. Engl. od Med.*, vol. 366, no. 2, pp. 158–164, 2012, doi: 10.1056 / NEJMcp1014163.
- [18] A. B. Lyons, N. Shabeeb, C. L. Nicholson, T. L. Braunberger, A. Peacock, and I. H. Hamzavi, “Emerging medical treatments for hidradenitis suppurativa,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 83, no. 2, pp. 554–562, 2020, doi: 10.1016/j.jaad.2020.04.009.
- [19] C. C. Zouboulis *et al.*, “European S1 guideline for the treatment of hidradenitis suppurativa/acne inversa,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 29, no. 4, pp. 619–644, 2015, doi: 10.1111/jdv.12966.
- [20] S. Khalil *et al.*, “Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects,” *J. Dermatolog. Treat.*, vol. 28, no. 8, pp. 684–696, 2017, doi: 10.1080/09546634.2017.1309349.
- [21] R. Sarkar, S. Chugh, and V. K. Garg, “Acitretin in dermatology,” *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, vol. 79, no. 6, pp. 759–771, 2013, doi: 10.4103/0378-6323.120721.
- [22] N. Noy, “Retinoid-binding proteins: Mediators of retinoid action,” *Biochem. J.*, vol. 348, no. 3, pp. 481–495, 2000, doi: 10.1042/0264-6021:3480481.
- [23] J. Bastien and C. Rochette-Egly, “Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes,” *Gene*, vol. 328, no. 1–2, pp. 1–16, 2004, doi: 10.1016/j.gene.2003.12.005.
- [24] E. Sbidian, “Acitretin,” *Ann. Dermatol. Venereol.*, vol. 146, no. 6–7, pp. 454–458, 2019, doi: 10.1016/j.annder.2019.04.008.
- [25] N. E. G. Ortiz, R. I. Nijhawan, and J. M. Weinberg, “Acitretin,” *Dermatol. Ther.*, vol. 26, no. 5, pp. 390–399, 2013, doi: 10.1111/dth.12086.
- [26] E. Hsia, M. J. Johnston, R. J. Houlden, W. H. Chern, and H. E. J. Hofland, “Effects of topically applied acitretin in reconstructed human epidermis and the rhino mouse,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, no. 1,

- pp. 125–130, 2008, doi: 10.1038/sj.jid.5700968.
- [27] C. C. Zouboulis, “Isotretinoin revisited: Pluripotent effects on human sebaceous gland cells,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, no. 10, pp. 2154–2156, 2006, doi: 10.1038/sj.jid.5700418.
- [28] F. Wang *et al.*, “Retinoic acid 4-hydroxylase inducibility and clinical response to isotretinoin in patients with acne,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 61, no. 2, pp. 252–258, 2009, doi: 10.1016/j.jaad.2009.03.013.
- [29] A. Imam *et al.*, “Retinoids as ligands and coactivators of protein kinase C alpha,” *FASEB J.*, vol. 15, no. 1, pp. 28–30, 2001, doi: 10.1096/fj.00-0329fje.
- [30] C. Chen *et al.*, “Negligible systemic absorption of topical isotretinoin cream: Implications for teratogenicity,” *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 37, no. 4, pp. 279–284, 1997, doi: 10.1002/j.1552-4604.1997.tb04303.x.
- [31] E. Sendagorta, J. Lesiewicz, and R. B. Armstrong, “Topical isotretinoin for photodamaged skin,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 27, no. 6, pp. S15–S18, 1992, doi: 10.1016/S0190-9622(08)80254-X.
- [32] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [33] J. Doshi and D. H. Reneker, “Electrospinning process and applications of electrospun fibers,” *Conf. Rec. - IAS Annu. Meet. (IEEE Ind. Appl. Soc.)*, vol. 3, pp. 1698–1703, 1993, doi: 10.1109/ias.1993.299067.
- [34] V. Tserki, C. Panayiotou, and J. Philippou, “Preparation and characterization of electrospun poly(butylene succinate-co-butylene adipate) nanofibrous nonwoven mats,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part N J. Nanoeng. Nanosyst.*, vol. 220, no. 2, pp. 71–79, 2006, doi: 10.1243/17403499JNN54.
- [35] M. Hernández Marín, “Desarrollo de nanofibras poliméricas con retinoides para el tratamiento de la hidradenitis supurativa,” Elche, 2020.
- [36] E. J. Torres-Martínez *et al.*, “Drugs Loaded into Electrospun Polymeric Nanofibers for Delivery,” *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 313–331, 2019, doi: 10.18433/jpps29674.
- [37] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, “Experimental characterization of electrospinning: The electrically forced jet and instabilities,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, no. 25, pp. 09955–09967, 2001, doi: 10.1016/s0032-3861(01)00540-7.
- [38] M. Bognitzki *et al.*, “Nanostructured Fibers via Electrospinning,” *Adv. Mater.*, vol. 13, no. 1, pp. 70–72, 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200101\)13:1<70::AID-ADMA70>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200101)13:1<70::AID-ADMA70>3.0.CO;2-H).
- [39] A. Frenot and I. S. Chronakis, “Polymer nanofibers assembled by electrospinning,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 64–75, 2003, doi: 10.1016/S1359-0294(03)00004-9.
- [40] A. M. Carrió, “Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas,” pp. 1–310, 2017.
- [41] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma, “Front Matter,” *An Introd. to Electrospinning*

- Nanofibers*, pp. i–xi, 2005, doi: 10.1142/9789812567611_fmatter.
- [42] T. J. Sill and H. A. von Recum, “Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [43] J. . Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. . Beck Tan, “NoThe effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles,” *Elsevier*, vol. 42, pp. 261–272, 2000, doi: 10.1016/s0032-3861(00)00250-0.
- [44] V. Sencadas *et al.*, “Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 2, pp. 1295–1301, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.017.
- [45] A. Mahapatro and D. K. Singh, “Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines.,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 9, p. 55, 2011, doi: 10.1186/1477-3155-9-55.
- [46] J. Xie, X. Li, and Y. Xia, “Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 29, no. 22, pp. 1775–1792, 2008, doi: 10.1002/marc.200800381.
- [47] S. Eap *et al.*, “A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 1061–1075, 2015, doi: 10.2147/IJN.S72670.
- [48] J. Gunn and M. Zhang, “Polyblend nanofibers for biomedical applications: Perspectives and challenges,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 189–197, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.006.
- [49] A. Mira, C. R. Mateo, R. Mallavia, and A. Falco, “Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17542-4.
- [50] A. Mira *et al.*, “Physico-chemically distinct nanomaterials synthesized from derivatives of a poly(Anhydride) diversify the spectrum of loadable antibiotics,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 3, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/nano10030486.
- [51] Á. Arias, “Nanofibras poliméricas con ácido 5-aminolevulínico: preparación, caracterización y estudio de liberación in vitro,” 2015.
- [52] L. Martínez-Ortega, A. Mira, A. Fernandez-Carvajal, C. Reyes Mateo, R. Mallavia, and A. Falco, “Development of a new delivery system based on drug-loadable electrospun nanofibers for psoriasis treatment,” *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11010014.
- [53] F. Characteristics, ““European Pharmacopeia,”” *J. Am. Pharm. Assoc.*, vol. 10, no. 2, p. 132, 1970, doi: 10.1016/s0003-0465(16)31141-7.
- [54] A. Gürbüz, G. Özhan, S. Güngör, and M. S. Erdal, “Colloidal carriers of isotretinoin for topical acne treatment: skin uptake, ATR-FTIR and in vitro cytotoxicity studies,” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 307, no. 7, pp. 607–615, 2015, doi: 10.1007/s00403-015-1566-y.

- [55] J. Liu, W. Hu, H. Chen, Q. Ni, H. Xu, and X. Yang, "Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 328, no. 2, pp. 191–195, 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.007.
- [56] I. I. A. Hashim, N. F. A. El-Magd, A. R. El-Sheakh, M. F. Hamed, and A. E. G. H. A. El-Gawad, "Pivotal role of acitretin nanovesicular gel for effective treatment of psoriasis: Ex vivo–in vivo evaluation study," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 1059–1079, 2018, doi: 10.2147/IJN.S156412.
- [57] M. R. Patel, R. B. Patel, J. R. Parikh, and B. G. Patel, "Improving the Isotretinoin Photostability by Incorporating in Microemulsion Matrix," *ISRN Pharm.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011, doi: 10.5402/2011/838016.
- [58] J. Fowles *et al.*, "A review of the toxicological and environmental hazards and risks of tetrahydrofuran," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 43, no. 10, pp. 811–828, 2013, doi: 10.3109/10408444.2013.836155.
- [59] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and S. C. Owen, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London and Chicago: Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association., 2006.
- [60] L. Ran, W. Tan, S. Tan, R. Zhang, W. Wang, and W. Zeng, "Effects of ATRA, acitretin and tazarotene on growth and apoptosis of Tca8113 cells," *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, vol. 25, no. 4, pp. 393–396, 2005, doi: 10.1007/bf02828205.
- [61] S. Shelake *et al.*, "Combination of 13 cis-retinoic acid and tolfenamic acid induces apoptosis and effectively inhibits high-risk neuroblastoma cell proliferation," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 46, pp. 92–99, 2015, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2015.07.012.
- [62] C. C. Zouboulis, B. P. Korge, D. Mischke, and C. E. Orfanos, "Altered proliferation, synthetic activity, and differentiation of cultured human sebocytes in the absence of vitamin A and their modulation by synthetic retinoids," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 101, no. 4, pp. 628–633, 1993, doi: 10.1111/1523-1747.ep12366092.
- [63] M. Schroeder and C. C. Zouboulis, "All-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid: Pharmacokinetics and biological activity in different cell culture models of human keratinocytes," *Horm. Metab. Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 136–140, 2007, doi: 10.1055/s-2007-961813.
- [64] X. Qin *et al.*, "Acitretin modulates HaCaT cells proliferation through STAT1- and STAT3-dependent signaling," *Saudi Pharm. J.*, vol. 25, no. 4, pp. 620–624, 2017, doi: 10.1016/j.jsps.2017.04.034.
- [65] M. Zhang, L. Zhu, Y. Feng, Y. Yang, L. Liu, and Y. Ran, "Effects of acitretin on proliferative inhibition and RANTES production of HaCaT cells," *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 300, no. 10, pp. 575–581, 2008, doi: 10.1007/s00403-008-0872-z.
- [66] J. Ding, W. R. Kam, J. Dieckow, and D. A. Sullivan, "The influence of 13-cis retinoic acid on human meibomian gland epithelial cells," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 6, pp. 4341–4350, 2013, doi: 10.1167/iovs.13-11863.

