



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia



ESTUDIO DE LA ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN *IN VITRO* DE O-ACETIL-L- CARNITINA y L-TRIPTÓFANO EN NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2023

Autor: Miguel Rodríguez Real

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Ricardo Mallavia Marín, Pedro Valentín Badía Hernández y Rocío Díaz Puertas

Resumen

Las nanofibras son materiales nanoestructurados particularmente útiles para encapsular principios activos, por lo que están ganando popularidad en una gran variedad de áreas, incluyendo la farmacia. En este trabajo se sintetizaron nanofibras usando el polímero poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maléico) (PMVEMA-Ac) y dos metabolitos, el L-Triptófano (L-Trp) y la O-Acetil-L-Carnitina (OALC). La viscosidad de las disoluciones se mantuvo constante pese a los aumentos de concentración de metabolitos. Se obtuvieron nanofibras homogéneas sin defectos visibles con un diámetro promedio de 367 ± 43 nm para las nanofibras con OALC y de 487 ± 104 nm para L-Trp. Además, se pudo observar mediante el uso de espectroscopía infrarroja que probablemente el metabolito estaba contenido dentro de las nanofibras, lo que se confirmó mediante la cromatografía líquida de alta resolución tras los ensayos preliminares de liberación controlada. Por tanto, este estudio demuestra que las nanofibras sintetizadas son capaces de encapsular eficazmente los metabolitos y presentan un gran potencial para su uso en la liberación controlada de principios activos en aplicaciones farmacéuticas.

Palabras clave: electrohilado, nanofibras, O-Acetil-L-Carnitina, L-Triptófano, HPLC, espectroscopía infrarroja, liberación controlada

Abstract

*Nanofibers are nanostructured materials that are particularly useful for encapsulating active compounds, which is why they are gaining popularity in a variety of areas, including the pharmaceutical field. In this study, nanofibers were synthesized using the polymer poly (methyl vinyl ether-*alt*-maleic acid) (PMVEMA) and two metabolites, L-Tryptophan (L-Trp) and O-Acetyl-L-Carnitine (OALC). The viscosity of the solutions remained constant despite increasing metabolite concentrations. Homogeneous nanofibers without visible defects were obtained, with an average diameter of 367 ± 43 nm for OALC and 487 ± 104 nm for L-Trp nanofibers. Furthermore, it was possible to observe, through the use of infrared spectroscopy, that the metabolite was likely contained within the nanofibers, which was confirmed through high-resolution liquid chromatography*

after preliminary controlled release assays. Therefore, this study demonstrates that the synthesized nanofibers are capable of effectively encapsulating the metabolites and present great potential for use in controlled release of active compounds in pharmaceutical applications.

Key words: electrospinning, nanofibers, L-Tryptophan, O-Acetyl-L-Carnitine, HPLC, infrared spectroscopy, controlled release.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Importancia de la vía transdérmica	5
1.2 Parches transdérmicos como sistema de liberación de metabolitos 6	
1.3 Relevancia de los nanofibras y polímeros en la actualidad	6
1.4 Electrohilado como técnica de elaboración de nanofibras	7
1.5 Propiedades de los polímeros	9
1.5.1. Poli (metil vinil éster-alt-ácido maleico (PMVEMA-Ac)	9
1.6 Nanofibras para la encapsulación de metabolitos	10
1.6.1 O-Acetil-L-Carnitina	10
1.6.2 L-Triptófano	11
1.7 Estudio de liberación <i>in vitro</i>	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Reactivos	14
3.2 Soluciones poliméricas	14
3.3 Elaboración de nanofibras por electrohilado	15
3.4 Caracterización de las nanofibras	15
3.4.1 Viscosidad	15
3.4.2 Microscopía óptica y electrónica de barrido de emisión de campo	16
3.5 Determinación cualitativa de las moléculas bioactivas	17
3.5.1 Espectroscopía infrarroja	17

3.6 Determinación cuantitativa de las moléculas bioactivas	17
3.6.1 Determinación de la cinética de liberación <i>in vitro</i>.....	17
3.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución.....	18
3.6.3 Recta de calibrado	19
3.6.4 Cuantificación de los metabolitos y estimación de la liberación.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 Determinación de la viscosidad	21
4.2 Optimización de los parámetros de electrohilado	21
4.3 Análisis de la morfología de las nanofibras	23
4.4 Evaluación cualitativa de la encapsulación de O-Acetil-L- Carnitina y L-Triptófano en poli (metil vinil éter-alt-ácido maléico) mediante espectroscopía infrarroja.....	27
4.5 Evaluación cuantitativa de los metabolitos mediante ensayos de celdas de Franz.....	29
5. CONCLUSIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la vía transdérmica

En la actualidad se dispone de una gran variedad de vías de administración de medicamentos. Dentro de las vías enterales destaca la vía oral, la cual se considera la más frecuentemente usada debido a su comodidad y bajo coste económico ⁽¹⁾. Además, cabe mencionar la vía sublingual, que permite un acceso inmediato a la vena cava, evitando el paso por el hígado y el intestino, lo que resulta en una acción más rápida del medicamento. Asimismo, la vía rectal se suele emplear en el caso de fármacos que producen problemas gastrointestinales o que son degradados por el sistema gastrointestinal ⁽²⁾.

En cuanto a las vías parenterales, existen varias opciones disponibles. La vía intravenosa se utiliza cuando se requiere una acción inmediata del medicamento. La vía intraarterial se utiliza ampliamente para la administración de contrastes radiológicos y quimioterapia. La vía intramuscular se emplea para medicamentos que se degradan en la vía oral, con primer paso hepático o en pacientes con una función gastrointestinal limitada. Por último, la vía subcutánea resulta útil, por ejemplo, en casos de implantes, ya que permite la administración constante de medicamento ⁽²⁾.

Otras vías de especial interés incluyen la vía intratecal, epidural, intraventricular y dérmica ⁽²⁾. La administración dérmica puede realizarse mediante formas farmacéuticas convencionales como cremas y geles, entre otros. Sin embargo, cuando se busca un efecto sistémico, las formas farmacéuticas dérmicas convencionales son poco útiles debido a la necesidad de una aplicación frecuente, su inestabilidad a largo plazo y la dificultad para determinar con precisión la dosis aplicada ⁽²⁾. Por ello, se han diseñado parches transdérmicos los cuales carecen de dichas desventajas ⁽³⁾.

La vía transdérmica es ideal para un perfil de paciente que necesite una administración repetida en el tiempo puesto que evita el primer paso hepático, es una vía de rápida absorción, sin variabilidad interindividual, con una prolongada duración de la acción y no dolorosa. Todo esto evita las desventajas

asociadas a otro tipo de vías como son el riesgo de hemorragia de la vía intravenosa, la inexactitud de la dosis administrada de la vía dérmica convencional, el requerimiento de personal sanitario especializado o un estricto control de su administración, entre otros factores ⁽³⁾. Dicha vía de administración además puede llegar a ser útil en pacientes poco adherentes que precisen de tomar medicación de manera frecuente al entregar de manera lenta y continua el fármaco durante horas-días ⁽²⁾.

1.2 Parches transdérmicos como sistema de liberación de metabolitos

Como se ha mencionado anteriormente, la vía transdérmica se realiza a través de parches transdérmicos, de los cuales actualmente se conocen dos tipos ⁽⁴⁾. Por un lado, están los parches reservorio, formados por una lámina adhesiva que se adhiere al cuerpo. Encima de esta lámina se encuentra una membrana polimérica que controla la liberación. A su vez, encima de la membrana polimérica se ubica un reservorio que contiene el fármaco o metabolito, y finalmente, una membrana impermeable cubre el reservorio. Este tipo de parches son más complejos en diseño, pero ofrecen un mayor control sobre el flujo de administración y además permiten una mayor flexibilidad en cuanto a la formulación.

Por otra parte, existen los parches tipo matriz, que mezclan fármaco-adhesivo en una estructura más simple, en la cual el flujo de administración viene determinado de forma general por la permeabilidad de la piel, ya que no presentan membranas poliméricas. La fabricación de estos parches es más económica, pero permiten una limitada flexibilidad a nivel de diseño.

1.3 Relevancia de los nanofibras y polímeros en la actualidad

Relacionado con ello, una de las maneras en las que se pueden desarrollar parches transdérmicos es mediante la síntesis de nanofibras. Las nanofibras son fibras con un tamaño menor a los 1000 nanómetros (nm). En comparación con las fibras convencionales, las nanofibras se caracterizan por sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta relación

superficie/volumen, alta porosidad y además son estructuras de bajo peso en relación a su diámetro ⁽⁵⁾, por lo que resultan de interés para su aplicación en organismos vivos. Estas características confieren una serie de propiedades, entre las cuales se incluyen la capacidad de encapsular fármacos, protegiéndolos de la descomposición en el torrente sanguíneo, la capacidad de su liberación de manera controlada en una zona específica y la propiedad de permear a través de algunas barreras fisiológicas como la piel ⁽³⁾.

Los primeros indicios de investigaciones sobre nanofibras se remontan al siglo XIX, cuando Charles Vernon Boys comenzó a explorar este campo ⁽⁶⁾. Desde entonces, las investigaciones en este ámbito han experimentado un crecimiento constante, y en la última década se ha generado un marcado interés debido a los avances tecnológicos en el campo de la nanotecnología, que han permitido la fabricación escalable de nanofibras a nivel industrial ⁽⁷⁾. Además, el campo de las nanofibras ha ido despertando cada vez más interés en diversas áreas de la ciencia como la ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos, aplicaciones dentales, implantes quirúrgicos, conservación de agentes biológicos, biosensores y apósitos para cicatrización ⁽⁸⁾.

1.4 Electrohilado como técnica de elaboración de nanofibras

La técnica más empleada para la elaboración de nanofibras es el electrohilado, también conocido en inglés como *electrospinning*. A través de esta técnica, es posible obtener nanofibras con morfología y tamaños controlados, lo cual hace que su caracterización sea de gran importancia. La técnica tiene sus orígenes en el siglo XIX y XX, cuando Rayleigh la descubrió por primera vez, Zeleny la estudio en detalle y Formhals la patentó posteriormente ⁽⁷⁾. Desde entonces, su uso y aplicaciones se encuentran cada vez más en expansión debido a que es una técnica de fácil escalabilidad, bajo coste, simple y de alta eficiencia ⁽⁸⁾. Para entender la técnica primero es esencial conocer en profundidad los componentes básicos de un aparato de electrohilado ⁽⁸⁾:

- 1) Jeringuilla con solución polimérica en su interior
- 2) Bomba de inyección
- 3) Aguja de acero inoxidable.

- 4) Fuente de alimentación.
- 5) Colector.

La configuración habitual del aparato puede disponerse de manera horizontal o vertical (Figura 1).

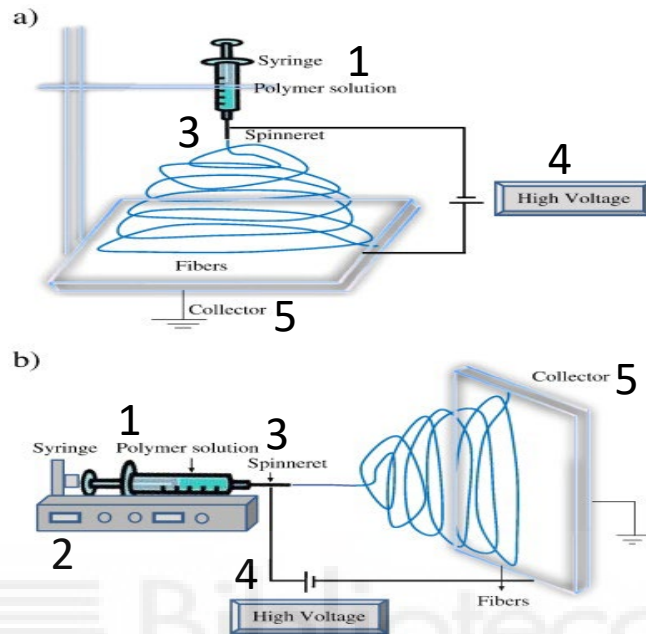


Figura 1: Esquema de un aparato de electrohilado dispuesto en horizontal (a) y vertical (b). Fuente: ⁽⁶⁾

La técnica consiste en la eyección del polímero a través de una jeringa con una aguja de acero inoxidable, con la ayuda de una bomba de inyección, a un flujo determinado. Por un lado, la fuente de alimentación se encuentra conectada a la aguja de acero inoxidable y por el otro al colector, por lo que va a formar así un campo eléctrico entre las dos superficies cargadas. Cuando a la solución polimérica se le aplica un voltaje que supera la tensión superficial de la gota se forma el “cono de Taylor” seguido de un chorro o *jet* en dirección hacia el colector. Durante el proceso de electrohilado el solvente que conformaba la solución polimérica se evapora, quedando en el colector las nanofibras en estado sólido ⁽⁷⁾.

Durante el uso de esta técnica se tienen que tener en cuenta parámetros relacionados al ambiente, los asociados al propio aparato de electrohilado y a la solución polimérica, tales como la viscosidad. Este último parámetro influye en gran medida en la morfología de las nanofibras ⁽⁹⁾.

1.5 Propiedades de los polímeros

Los polímeros son utilizados como materia prima en la fabricación de nanofibras. Estos pueden clasificarse en dos categorías: naturales y sintéticos. Los polímeros naturales son económicos, no tóxicos y fácilmente disponibles. Sin embargo, presentan problemas de inconsistencia en la formulaciones debido a la variabilidad de los lotes, lo que resulta en baja reproducibilidad de los ensayos e inestabilidad a largo plazo.

Por otro lado, los polímeros sintéticos presentan alta homogeneidad entre lotes, formación controlable, propiedades mecánicas, gran capacidad de ser diseñados para tener un amplio rango de propiedades y una extensa vida útil ⁽¹⁰⁾.

El uso de polímeros hoy en día se encuentra en auge debido a su amplia variedad de aplicaciones como son la fabricación de apósitos para cicatrización, ingeniería de tejidos vasculares, liberación sostenida de medicamentos, implantes y filtración molecular, entre otros ⁽¹⁰⁾.

1.5.1. Poli (metil vinil éster-*alt*-ácido maleico (PMVEMA-Ac)

Uno de los polímeros sintéticos empleados para la síntesis de nanofibras es el poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maléico) (PMVEMA-Ac) (Figura 2). Este polímero presenta características favorables para su aplicación, como su biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad ⁽¹¹⁾. Además, tiene propiedades bioadhesivas de interés farmacéutico, por lo que se ha empleado, por ejemplo, para la preparación de parches de atorvastatina que incrementan la absorción percutánea como alternativa a la vía oral para el tratamiento de las dislipemias ⁽¹²⁾, para la preparación de parches de ácido salicílico, salicilato de metilo y capsaicina contra la psoriasis ⁽¹³⁾ o para la realización de hidrogeles para el tratamiento del cáncer de ovario ⁽¹⁴⁾.

El PMVEMA-Ac surge de la síntesis de un copolímero ácido maléico y de metil vinil éter que, tras su reacción, forman un único polímero llamado poli (metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico). Este último, si reacciona con agua desencadena en la formación de PMVEMA-Ac y, por otro lado, si reacciona con etanol da lugar a poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maleico monoetil éster).

Dados los antecedentes del PMVEMA-Ac, podemos afirmar que resulta muy útil en la carga de medicamentos y metabolitos para administración a través de la vía transdérmica.

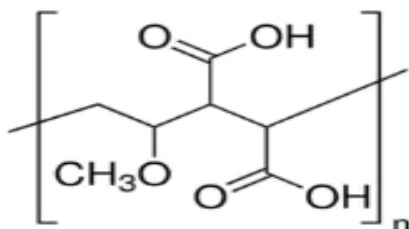


Figura 2 Estructura química del poli(metil vinil éter-alt-ácido maleico)

1.6 Nanofibras para la encapsulación de metabolitos

Como se ha mencionado anteriormente, las nanofibras presentan propiedades únicas para la encapsulación de metabolitos. En este trabajo, se encapsularán dos metabolitos, la O-Acetil-L-Carnitina (OALC) y el L-Triptófano (L-Trp), cada uno con unas propiedades y aplicaciones de interés farmacéutico.

1.6.1 O-Acetil-L-Carnitina

La OALC (Figura 3) es un derivado de aminoácido que se produce de manera fisiológica en el cuerpo conocido por ser agonista parcial de los receptores colinérgicos ⁽¹⁵⁾ y entre otras funciones de especial interés destaca su participación en el metabolismo de los ácidos grasos ⁽¹⁶⁾. Por ello suele ser utilizado ampliamente como energizante. De entre sus aspectos farmacéuticos de interés encontramos:

- Estudios sugieren que mejora el deterioro del aprendizaje espacial, ya que dicha patología está relacionada con la disminución de los receptores nicotínicos de acetilcolina ⁽¹⁵⁾.
- Ha mostrado efecto protector sobre el sistema nervioso central, puesto que existen estudios que sugieren que incrementa el factor neurotrófico derivado del cerebro de manera dosis dependiente. Por otro lado, también mejora la actividad del factor de crecimiento nervioso y la señalización extracelular de quinasas, favoreciendo así un mantenimiento y desarrollo

correcto de la neuronas. De entre la literatura más destacada relacionada con dicha neuroprotección encontramos efectos beneficiosos sobre el daño cerebral inducido por hipoxia isquémica neonatal, en la muerte de células madre, sobre el estrés oxidativo, etc. ⁽¹⁷⁾.

- Se han observado efectos antidepresivos puesto que tiene acción sobre numerosas vías de señalización relacionadas con la patología ⁽¹⁷⁾.
- Se han demostrado efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas ⁽¹⁷⁾.
- Ha mostrado protección frente a la ototoxicidad producida por cisplatino reduciendo la producción de interleucinas y citocinas proinflamatorias ⁽¹⁸⁾.
- Se han diseñado biosensores para poder detectar OALC en muestras ⁽¹⁹⁾.

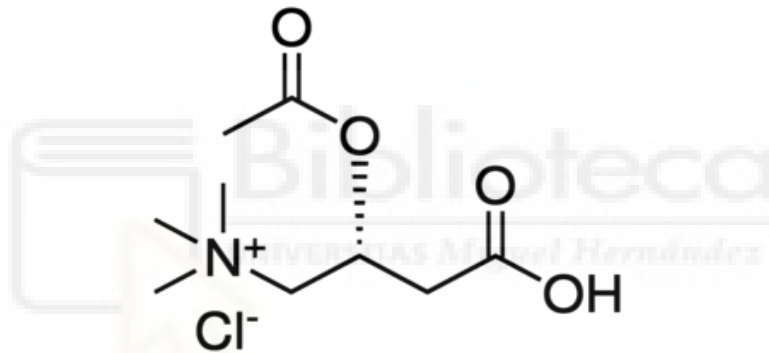


Figura 3 Estructura química de la O-Acetil-L-Carnitina en forma de clorhidrato

1.6.2 L-Triptófano

Otro metabolito de relevancia es el L-Trp (Figura 4). Se trata de un aminoácido precursor de la serotonina (5-HT) el cual incrementa la síntesis, función y estimula la liberación serotonina. Este neurotransmisor posee un papel esencial en el cerebro y su déficit se relaciona con la fisiopatología diversas enfermedades tales como enfermedad del párkinson, discinesia tardía, enfermedad de Huntington, temblor esencial familiar, mioclonías, trastornos del sueño, analgesia, epilepsia, esquizofrenia, manía, depresión, trastorno de ansiedad, trastorno obsesivo compulsivo o bulimia ⁽²⁰⁾.

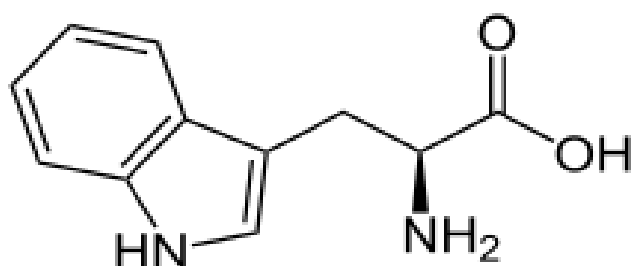


Figura 4 Estructura química del L-Triptófano

1.7 Estudio de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación *in vitro* con celdas de Franz son útiles para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, para control de calidad y el análisis de toxicidad ⁽²¹⁾. Habitualmente estos ensayos se hacen con membranas artificiales o piel, sin embargo, suelen recurrir a membranas artificiales, como es el caso de este Trabajo de Fin de Grado. Destacar que son membranas fáciles de obtener, conservar, menos costosas, estructuralmente más simples y tienen una alta reproducibilidad respecto a las membranas naturales ⁽²¹⁾.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es la síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac como sistema de liberación de OALC y L-Trp.

Objetivos específicos

Con el fin de alcanzar el objetivo general establecido, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Preparación y optimización de disoluciones de distintas concentraciones de OALC y L-Trp con PMVEMA-Ac en agua.
- Optimización de los parámetros de electrohilado y elaboración de nanofibras mediante dicha técnica.
- Caracterización de las nanofibras mediante imágenes obtenidas por microscopía óptica para realizar un cribado rápido y microscopía electrónica de barrido para analizarlas en detalle.
- Evaluación cualitativa de la encapsulación de OALC y L-Trp en PMVEMA-Ac mediante espectroscopía infrarroja.
- Determinación de la cinética de liberación de los metabolitos encapsulados en nanofibras mediante el uso de celdas de Franz.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Como metabolitos se emplearon la OALC en forma de hidrocloreuro con una pureza $\geq 99\%$ y peso molecular de 239,170 g/mol y el L-Trp con una pureza $\geq 99\%$ y peso molecular de 204,24 g/mol (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

Como polímero se utilizó el PMVEMA-Ac de peso molecular 1.980.000,00 g/mol (Sigma-Aldrich).

Como disolventes se empleó agua miliQ, procedente del dispositivo Mili-Q Q-Pod (Sigma-Aldrich), acetonitrilo (PanReac AppliChem, Castellar del vallés, Barcelona, España) con una pureza $\geq 99\%$ y peso molecular 41,05 g/mol y ácido fórmico con una pureza $\geq 98\%$ y peso molecular de 46,03 g/mol (Honeywell, Charlotte, Carolina del norte, Estados unidos).

3.2 Soluciones poliméricas

Por un lado, se preparó una disolución stock al 20 % p/p de PMVEMA-Ac. Para ello se mezcló PMVEMA-Ac y agua y se dejó en agitación constante durante 1 hora. Tras esto, se sonicó durante 10 minutos con el objetivo de eliminar las burbujas presentes en la muestra, puesto que se trata de una solución con elevada viscosidad y la presencia de burbujas puede alterar la formación de correctas nanofibras en el electrohilado. Por otro lado, se prepararon disoluciones stock de concentraciones crecientes en OALC. Para ello, se mezcló OALC con agua y se dejó en agitación constante media hora.

Finalmente, se mezclaron en proporciones adecuadas las soluciones stock de PMVEMA-Ac y OALC, se dejó media hora en agitación constante y se sonicó durante 10 minutos. Para la realización de soluciones poliméricas con L-Trp se siguió el mismo procedimiento.

Se obtuvieron 6 soluciones finales:

- 1) PMVEMA-Ac 20 % p/p.
- 2) PMVEMA-Ac 20 % p/p + OALC 1% p/p.

- 3) PMVEMA-Ac 20 % p/p + OALC 5% p/p.
- 4) PMVEMA-Ac 20 % p/p + OALC 10% p/p.
- 5) PMVEMA-Ac 20 % p/p + L-Trp 2 % p/p.
- 6) PMVEMA-Ac 20 % p/p + L-Trp 3,75 % p/p.

Todas las soluciones poliméricas que contenían OALC de este apartado se prepararon a 25 ± 5 °C y se conservaron a 4 °C. Por otro lado, las soluciones poliméricas que contenían L-Trp se conservaron a temperatura ambiente debido a la baja solubilidad en agua del L-Trp, para evitar así su precipitación.

Se eligieron estas concentraciones debido a que se buscaba observar el efecto de la carga de metabolitos en las nanofibras a medida que aumenta la concentración, sin embargo, no se pudieron añadir a más concentración debido a problemas de solubilidad.

3.3 Elaboración de nanofibras por electrohilado

Las nanofibras se elaboraron mediante electrohilado. Para ello, las soluciones se introdujeron en jeringas de 2 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) unidas a una aguja acero inoxidable 316, calibre 1,2 mm y punta roma con un ángulo de 90° (Sigma Aldrich). Las disoluciones se electrohilaban a un flujo constante controlado por una bomba de infusión KDScientific-100-CE (KD Scientific, Holliston, MA, Estados Unidos) y usando una fuente de alto voltaje Glassman High Voltage FC60P2 (Glassman High Voltage Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, Estados Unidos). El equipo de electrohilado se encuentra protegido con una caja de metacrilato que debe permanecer cerrada cuando el equipo se encuentre funcionando.

3.4 Caracterización de las nanofibras

3.4.1 Viscosidad

La viscosidad se determinó para conocer si la muestra es electrohilable. Para ello, se empleó un viscosímetro capilar Vidra Foc (Barcelona, España). Se midió el tiempo que tardaba en pasar el líquido entre las 2 marcas del tubo, se calculó la densidad, y con una constante proporcionada por el fabricante para dicho viscosímetro se obtuvo la viscosidad en centipoise (cP).

3.4.2 Microscopía óptica y electrónica de barrido de emisión de campo

Tras la obtención las fibras mediante la técnica de electrohilado se analizó la morfología de las nanofibras, es decir, diámetro y uniformidad. En primer lugar, se empleó un microscopio óptico MycosystemsDMI3000B (Leica, Bensheim, Alemania) con una fuente de luz LEICA EL6000 y una cámara digital Leica DFC 3000G. Las imágenes fueron analizadas usando el programa Leica Application Suite AF 6000 Module Systems. Con el objetivo de lograr una caracterización de fibras más precisa se utilizó la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) (Figura 5) con un aparato Schottky de emisión de campo de cátodo caliente modelo SIGMA 300 VP (Oberkochen, Alemania).

Las muestras se analizaron empleando el programa informático Image J en el que se hicieron 100 medidas de diferentes diámetros de diferentes nanofibras. Posteriormente las muestras fueron examinadas mediante la realización de un histograma con el *software* GraphPad Prism 8.



Figura 5 Interior del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) SIGMA 300 VP.

3.5 Determinación cualitativa de las moléculas bioactivas

3.5.1 Espectroscopía infrarroja

Para poder determinar la presencia de OALC y L-Trp en las nanofibras, se empleó un espectrómetro de infrarrojo Spectrum Two™ (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para ello, se prepararon pastillas utilizando de bromuro de potasio (KBr) (Sigma-Aldrich) con el metabolito y el PMVMEA-Ac correspondiente, siguiendo los pasos descritos a continuación:

- 1) Disminución del tamaño de grano: En un mortero se añadió primero el KBr, se homogeneizó con el pistilo y posteriormente se añadió la muestra a analizar.
- 2) Dicha mezcla de polvos se vertió sobre un molde de 13 mm (SPECAC, Cray Ave, Orpington, Reino Unido).
- 3) Se empleó una prensa hidráulica manual (SPECAC) y tras 10 minutos se obtuvo el comprimido.
- 4) Se introdujo el comprimido en el espectrómetro de infrarrojo y se analizó.

3.6 Determinación cuantitativa de las moléculas bioactivas

3.6.1 Determinación de la cinética de liberación *in vitro*

Para determinar la liberación *in vitro* de los metabolitos encapsulados en las nanofibras poliméricas se emplearon Celdas de Franz (PermeGear, Leithsville Rd, Hellertown, PA, Estados Unidos) (Figura 6). Estas cuentan con un cámara dadora que contiene la membrana sobre la que se deposita el polímero y una cámara receptora con un volumen de 5,2 ml de donde se van tomando muestras a través del brazo de muestreo, acompañadas de un agitador magnético de IKA Laboratory Equipment (Staufen, Alemania) y adheridas a un baño termostático Selecta digirtem-100 de JP selecta (Abrera, Barcelona) empleado para mantener las celdas a una temperatura constante de 32°C, la temperatura de la piel, a través de la camisa de agua.

En cuanto a la membrana empleada, se utilizó una membrana sintética de 25 mm Strat-M proporcionada por Millipore Corporation (Burlington, Massachusetts, Estados Unidos).

Para la realización del ensayo, las celdas se rellenaron con agua Mili-Q. Después, se colocó la membrana Strat-M seguida del compartimento donador junto con una pinza. Tras ello, se añadió el velo de cada solución polimérica en el compartimento donador y se disolvió con 100 μ l de agua Mili-Q. Por último, se tomaron muestras de 200 μ l a 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas. Las muestras fueron introducidas en el congelador a -20 °C para preservar su estabilidad y ser analizadas posteriormente.

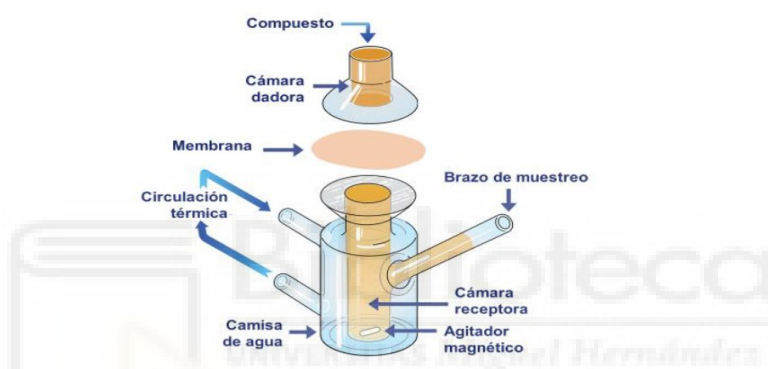


Figura 6 Composición de una celda de Franz, versión adaptada.

Fuente: <https://permegear.com/franz-cells/>

Se realizó un primer ensayo preliminar con una única celda para cada compuesto en el que se aseguró el funcionamiento de las celdas con el sistema de nanofibras, y para asegurar que los metabolitos liberados a las celdas se encontraban dentro del límite de detección del equipo usado para su análisis. El ensayo posterior de liberación se realizó con réplicas de tres celdas. Además, las membranas de este ensayo se conservaron para su posterior análisis.

3.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución

La detección de los metabolitos de manera cualitativa y cuantitativa se realizó por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a espectrometría de masas con un equipo Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Kioto, Japón) que se compone de una unidad desgasificadora, un horno termostaticado, un inyector automático, dos bombas unitarias y un detector diodo

array, junto con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo equipado con una interfase de ionización de electrospray. El procesado de datos se realizó mediante el software *LabSolutions* de Shimadzu. Se empleó la columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4mm, 5 μ m) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Se utilizaron como eluyentes una fase A que se compone de agua con ácido fórmico al 0,1 % v/v y una fase B que se compone de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % v/v, a un flujo de 0,5 ml/min y una duración del análisis 30 minutos. El gradiente empleado en la separación cromatográfica de ambos metabolitos encapsulados en nanofibras es: 0 minutos – 1 % B, 21 minutos – 99 % B, 27 minutos – 99 % B y 30 minutos – 1 % B.

Se llevó a cabo una optimización de los parámetros de detección del espectrómetro de masas, que realiza una fragmentación de las moléculas, automáticamente con el *software* del equipo. Las masas de las moléculas ionizadas detectadas fueron 204,2 y 205,2 m/z y las masas de los fragmentos generados 85,05 y 188,05 m/z para el L-Trp y la OALC, respectivamente. Estas últimas se emplearon en la cuantificación.

3.6.3 Recta de calibrado

Para la cuantificación de las muestras del ensayo de celdas de Franz se elaboró una recta de calibrado de L-Trp y OALC en agua con nueve concentraciones seriadas en un rango comprendido entre 0,06 y 0,0009 mg/ml. Para la cuantificación de los metabolitos que se habían quedado en la membrana se realizó una recta de calibrado a diferentes concentraciones de L-Trp y OALC en agua con nueve concentraciones seriadas en un rango comprendido entre 0,006 y 0,00004688 en mg/ml. Posteriormente se inyectó 20 μ l de cada punto de la recta por duplicado y se correlacionó la concentración con el área bajo la curva pico obtenida, consiguiendo la ecuación de la recta correspondiente de cada caso.

3.6.4 Cuantificación de los metabolitos y estimación de la liberación

Se inyectaron 20 μl de cada muestra tomada en cada tiempo y celda por duplicado y se obtuvo el área de cada pico correspondiente a cada compuesto para obtener su concentración. Adicionalmente, se disolvieron fibras de los stocks utilizados en agua para su detección por HPLC. A las membranas de los ensayos de liberación almacenadas se les añadió agua para disolver los posibles metabolitos que hubiera en ellas y se analizaron de igual manera. A partir de las rectas patrón, se calculó la concentración de las muestras del ensayo.

La estimación de la absorción se obtuvo utilizando la concentración de cada muestra, la cual corresponde a la concentración de las celdas de Franz en cada tiempo, así como de la cantidad que se extrajo en cada muestra. De esta forma, es posible obtener la cantidad acumulada liberada para posteriormente dividirla entre el área disponible de la membrana, con lo que se obtiene Q_n (la cantidad acumulada liberada por centímetro cuadrado) que se recoge en la Ecuación 1.

$$(1) \quad Q_n = \frac{C_n \cdot V_c + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i \cdot V_m)}{A}$$

Ecuación 1 Cálculo la cantidad acumulada liberada por centímetro cuadrado (Q_n) en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a partir de la concentración de la muestra a tiempo n en mg/l (C_n), volumen de la celda en ml (5.2) (V_c), sumatorio de la concentración (C_i) por volumen de muestra (0.2ml) (V_m) y todo ello dividido entre el área disponible de la membrana (A). Fuente:

(21)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la viscosidad

Un parámetro esencial para determinar si una solución es o no electrohilable es la viscosidad. Para ello se midieron las viscosidades de las siguientes muestras:

- PMVEMA-Ac 20 % = 1748 cP.
- PMVEMA-Ac 20 % y L-Trp 3,75 % = 1766 cP.
- PMVEMA-Ac 20 % y OALC 10 % = 1756 cP.

Todas las muestras, según la bibliografía, son adecuadas para electrohilado ya que se encuentran en el intervalo de óptimo de viscosidad, es decir, entre 100 – 2000 cP ⁽²²⁾.

En cuanto a las viscosidades de las 3 muestras, no se observan grandes diferencias entre ellas, probablemente debido a que los metabolitos se adicionaron en muy pequeñas cantidades.

4.2 Optimización de los parámetros de electrohilado

Con el objetivo de conocer la morfología de las nanofibras, se probaron diferentes parámetros de electrohilado basados en antecedentes experimentales del laboratorio y se realizó un cribado con el microscopio óptico. Estos resultados se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros empleados en el cribado inicial de síntesis de nanofibras.

Disolución de PMVEMA-Ac 20%	Parámetros de electrohilado	Resultado
OALC al 1 %, 5 % y 10 %	0,5 ml/h y 1kV/cm	Fibras homogéneas, pero al formar velo se observa electropray
	0,5ml/h y 1,33 kV/cm	Electrospray
	0,25ml/h y 1kV/cm	Fibras de diferente morfología junto con cintas y electropray
	0,25 ml/h y 1,5 kV/cm	Fibras de homogéneas, pero al formar velo se observan <i>beads</i>
	0,25 ml/h y 1,6 kV/cm	Fibras homogéneas con pocos defectos morfológicos y muy pocas cintas
L-Trp al 2 % y 3,75 %	0,25 ml/h y 1,6 kV/cm	Por un lado, existe una población de fibras homogéneas acompañadas de otra población muy pocas cintas

Los principales defectos observados en el electrohilado son la formación de *beads*, cintas y *electrospray* ⁽²³⁾.

El *electrospray* es la formación de gotas en el proceso de electrospinning. En este caso, en las muestra situadas a 15 cm el campo eléctrico generado está menos concentrado. Este es esencial, ya que mejora enormemente la tasa de transferencia de calor entre el medio ambiente y el *jet*. Cuando la tasa no es adecuada las nanofibras no se solidifican por completo dando lugar a las gotas.

Los *beads* son engrosamientos parciales, en forma de perla, de las nanofibras. Estos se forman de la mezcla resultante de agua y PMVEMA-Ac debido a que el

voltaje no es el suficiente como para evaporar todo el agua, por ello, se aumentó posteriormente dicho parámetro.

Las cintas son estructuras planas derivadas del electrohilado formadas por interacciones inter/intramoleculares del polímero, estas interacciones dificultan la formación del *jet* dando como resultado su peculiar forma ⁽²³⁾. Es importante destacar que estas anomalías de electrohilado no se dan de manera muy acusada en las muestras.

Tras todas las pruebas realizadas, se determinó que las condiciones ideales eran 16 kV, 10 cm y 0,25 ml/h y que han servido para comparar los dos compuestos objeto de este trabajo en las mismas condiciones de procesado.

4.3 Análisis de la morfología de las nanofibras

Las muestras sintetizadas se analizaron con FESEM. Las imágenes obtenidas permitieron analizar caracterizar minuciosamente los diámetros de las nanofibras y observar en detalle la morfología de las nanofibras.

Para las nanofibras solamente de polímero (PMVMEA-Ac 20 %) se consiguieron nanofibras con un diámetro medio de 299 ± 40 nanómetros. Se obtuvo un histograma (Figura 7A) que se ajustó a una curva Gaussiana dando una R^2 de 0,87 con una amplitud (A) de 19. El diámetro medio obtenido no difiere en exceso con el que se recoge en la bibliografía para nanofibras de PMVMEA-Ac ⁽²⁴⁾. Sin embargo, se obtuvo una R^2 baja, esto es debido a la presencia de tres subpoblaciones diferenciadas, la mayor es la presente sobre los 410nm y las otras dos rondan sobre los 330 nm y entorno a los 400 nm. La generación de las distintas subpoblaciones probablemente sea debido a que en ocasiones y de manera transitoria se forman varios *jets* ⁽²³⁾. En relación al aspecto de las nanofibras, este fue homogéneo (Figura 7B).

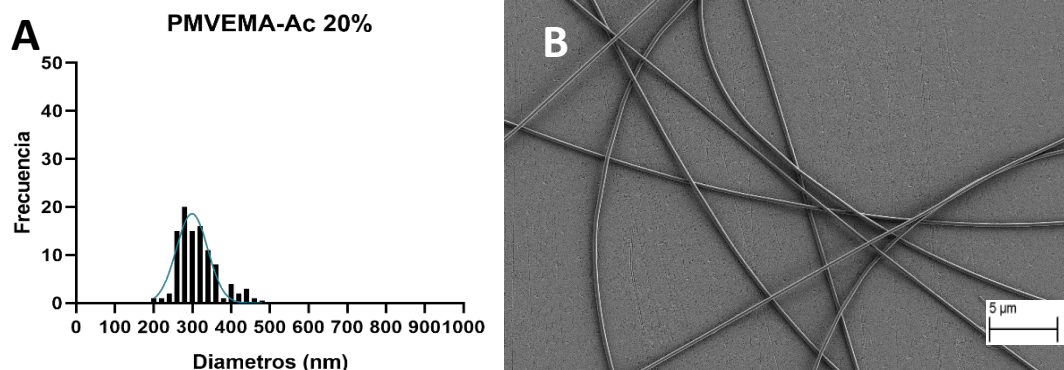


Figura 7 (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20 % obtenida mediante FESEM.

Para las nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % + OALC 1 % se consiguieron nanofibras con un diámetro medio de 375 ± 50 nm. Se obtuvo un histograma (Figura 8A) que se ajustó a una curva Gaussiana dando una R^2 de 0,87 con una amplitud (A) de 15. Sin embargo, también se obtuvo una R^2 baja debido de nuevo a la presencia de tres subpoblaciones diferenciadas. La mayor fue la presente sobre los 390 nm y las otras dos rondaron los 320 y los 450 nm. El mayor tamaño en comparación a las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% se atribuye a la carga de metabolito en la fibra que, como consecuencia, aumenta su tamaño. El aspecto de las nanofibras también fue homogéneo (Figura 8B).

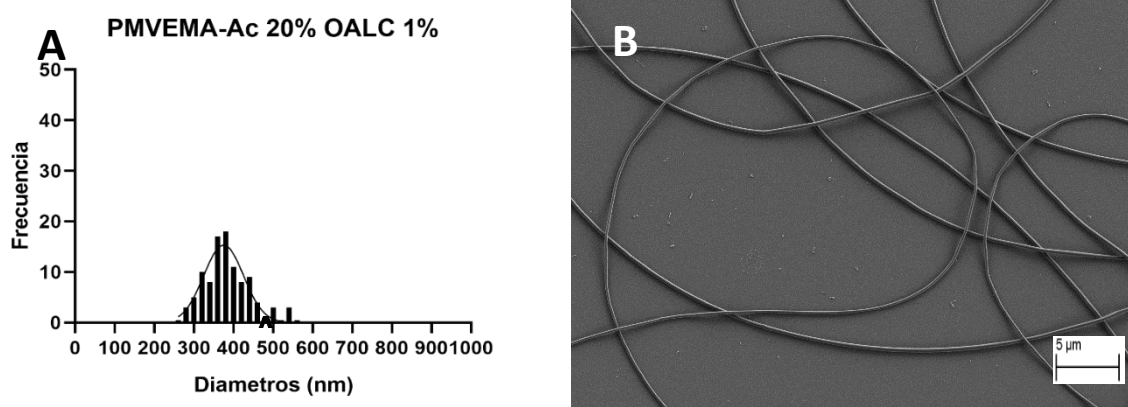


Figura 8 (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con OALC 1 % (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20 % con OALC 1 % obtenida mediante FESEM.

Para las nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % + OALC 5 % se consiguieron nanofibras con un diámetro medio de 386 ± 42 nm, un tamaño similar al caso anterior. Se obtuvo un histograma (Figura 9A) que se ajustó a una curva Gaussiana dando una R^2 de 0,96 con una amplitud (A) de 40. Además, se obtuvieron en general nanofibras de morfología correcta, encontrando de manera poco frecuente la presencia de cintas (Figura 9B).

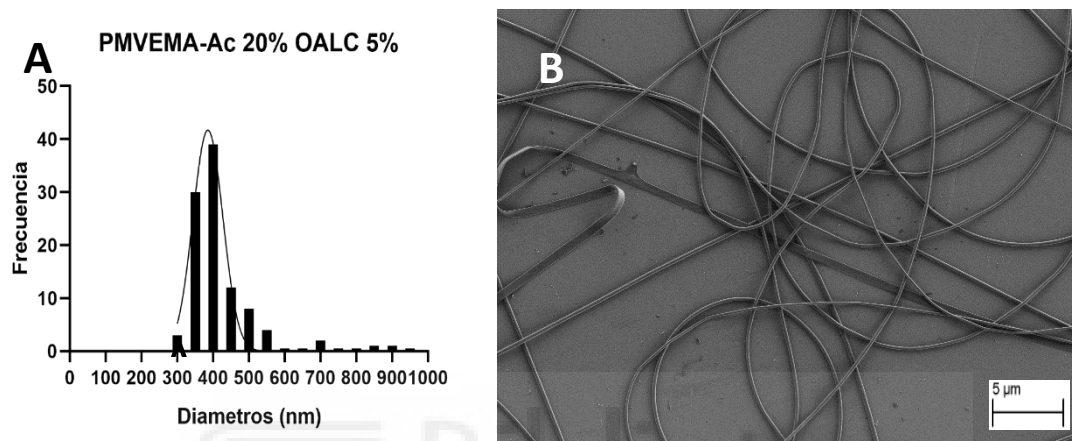


Figura 9 (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con OALC 5 % (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20 % con OALC 5 % obtenida mediante FESEM.

Para las nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % + OALC 10 % se consiguieron nanofibras con un diámetro medio de 341 ± 36 nm. En esta ocasión, el tamaño es similar a las anteriores muestras, lo que sugiere que estamos alcanzando el límite de saturación de la nanofibra. Se obtuvo un histograma (Figura 10A) que se ajustó a una curva Gaussiana dando una R^2 de 0,73 con una amplitud (A) de 11. Sin embargo, se obtuvo una R^2 baja probablemente debido a la presencia de dos subpoblaciones diferenciadas, la mayor fue la presente sobre los 340 nm y la otra rondó los 400 nm. Además, se obtuvieron nanofibras sin defectos aparentes (Figura 10B).

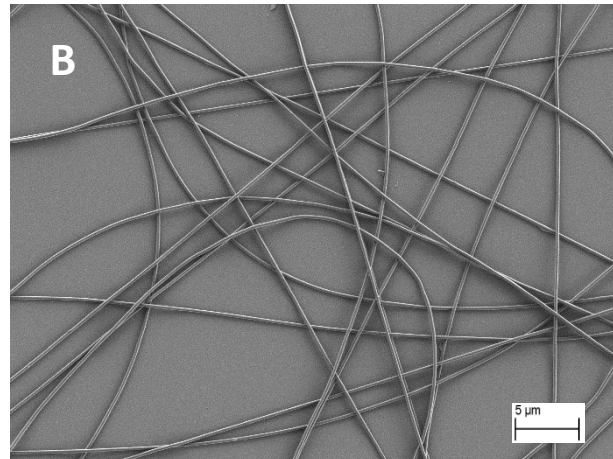
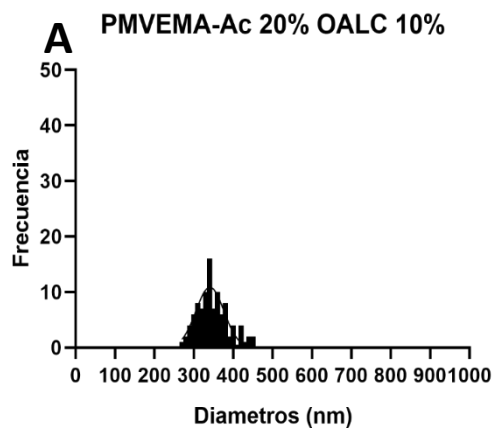


Figura 10 (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con OALC 10 % (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20 % con OALC 10 % obtenida mediante FESEM.

Por otro lado, se consiguieron nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % + L-Trp 2 % con un diámetro medio de 478 ± 105 nm. Se obtuvo un histograma (Figura 11A) que se ajustó a una curva Gaussiana dando una R^2 de 0,96 con una amplitud (A) de 19. Además, se obtuvieron nanofibras homogéneas con poca frecuencia de cintas (Figura 11B). De nuevo, el incremento de tamaño con respecto a las nanofibras solo con PMVEMA-Ac 20 % se atribuye a que se están cargando las nanofibras con metabolito.

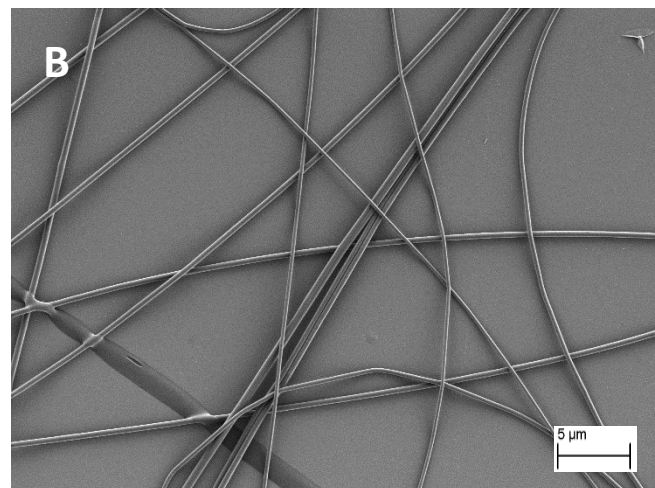
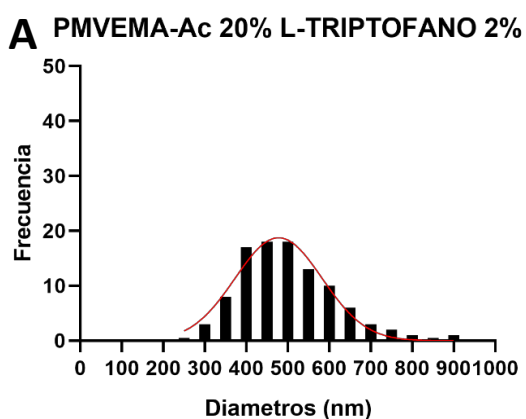


Figura 11 (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con L-Trp 2 % (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20 % con L-Trp 2 % obtenida mediante FESEM.

Con la disolución de PMVEMA-Ac 20 % + L-Trp 3,75 % se consiguieron nanofibras con un diámetro medio de 497 ± 102 nm. Se obtuvo un histograma (Figura 12A) que se ajustó a una curva Gaussiana dando una R^2 de 0,89 con una amplitud (A) de 19. La R^2 más baja es debida a la presencia de tres subpoblaciones, la mayor es la presente sobre los 400 nm y las otras dos rondan sobre los 700 nm y los 400 nm. El aspecto de las nanofibras fue homogéneo (Figura 12B).

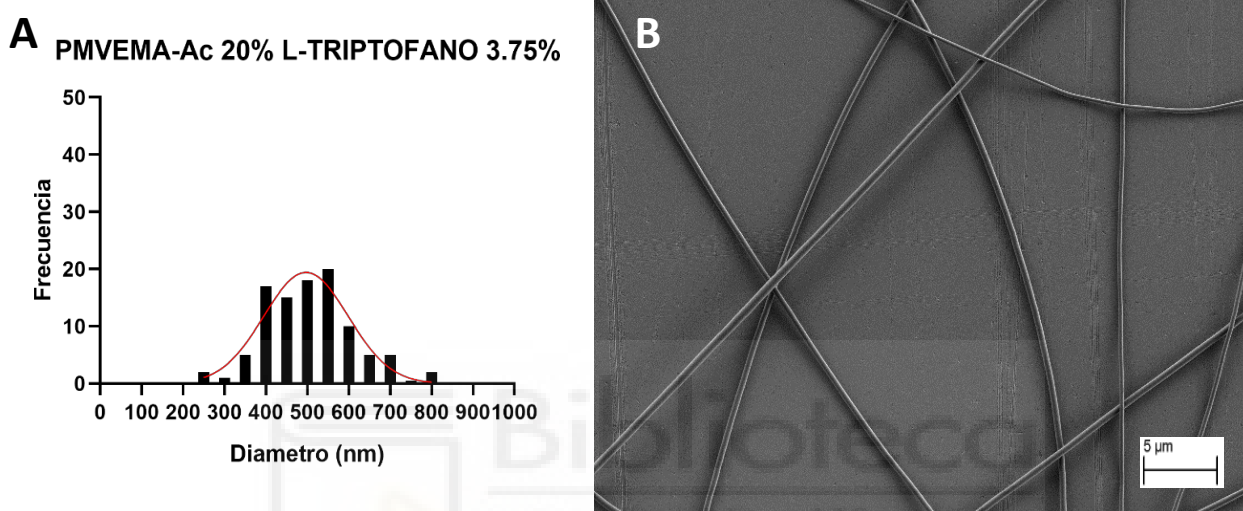


Figura 12 (A) Histograma de nanofibras de PMVEMA-Ac 20% con L-Trp 3.75% (B) Imagen de PMVEMA-Ac 20% con L-Trp 3.75% obtenida mediante FESEM.

4.4 Evaluación cualitativa de la encapsulación de O-Acetil-L-Carnitina y L-Triptófano en poli (metil vinil éter-alt-ácido maléico) mediante espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los enlaces de una molécula, por lo que de esta manera se puede observar la presencia de un compuesto en una muestra ⁽²⁵⁾.

Tras el análisis de las muestras, por un lado, se obtuvo un espectro de PMVEMA-Ac 20 % como nanofibras, OALC como polvo y PMVEMA-Ac 20 % con OALC 10 % como nanofibras (Figura 13). En lo referente al PMVEMA-Ac 20 % (color negro), para el grupo ácido carboxílico se encuentra una banda muy ancha entre $3500-2750$ cm^{-1} correspondiente a la tensión -OH, otra a 1714 cm^{-1} correspondiente a la tensión C=O y una última a 1234 cm^{-1} correspondiente a la

tensión C-O ⁽²⁶⁾. Por otro lado, para el grupo éter se detecta una banda a 1100 cm^{-1} correspondiente a la tensión C-O ⁽²⁶⁾.

En lo referente a la OALC (color rojo), para el grupo amino encontramos dos bandas, simétrica y asimétrica, a 3500 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} correspondientes a la tensión N-H y dos bandas a 1500 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} correspondientes a la flexión N-H (26). Para el grupo ácido vemos una banda ancha entre 3200 cm^{-1} – 2400 cm^{-1} correspondiente a la tensión O-H, otra banda a 1715 cm^{-1} correspondiente a la tensión C=O y otra a 1300 cm^{-1} correspondiente a la tensión C-O ⁽²⁶⁾.

En cuanto al espectro de las nanofibras de PVEMA-Ac 20 % con OALC al 10 % (color verde), observamos que obtenemos un espectro similar al de solo PMVEMA-Ac 20 %, sin embargo, los picos correspondientes al grupo ácido carboxílico destacan con una mayor intensidad, hecho que nos hace indicar que posiblemente nuestro metabolito se encuentre encapsulado en las nanofibras.

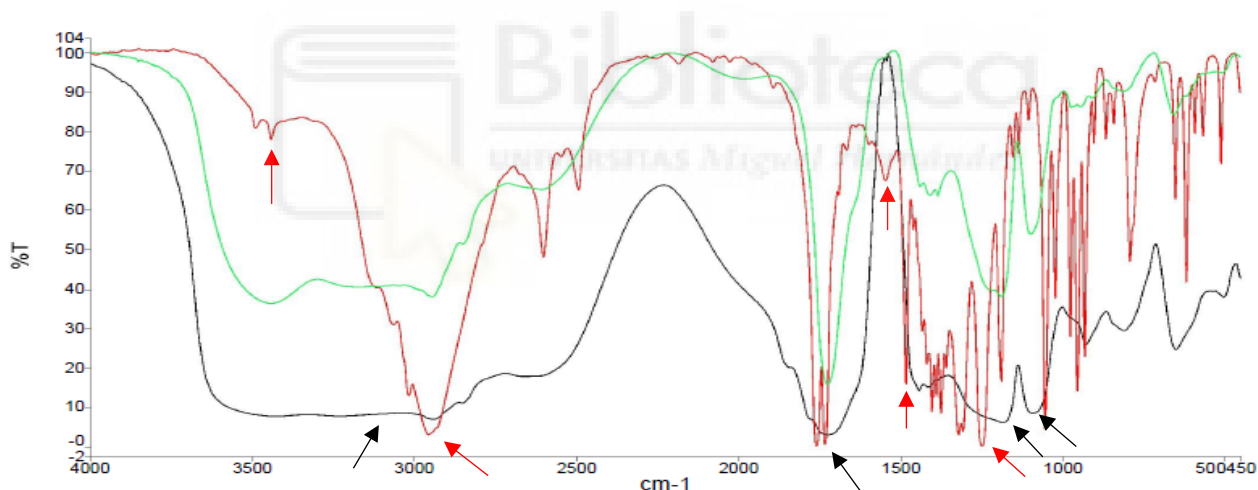


Figura 13 Espectro de infrarrojo de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 %, en color negro, OALC , en color rojo, y PMVEMA-Ac 20 % con OALC 10%, en color verde.

Por otro lado, se obtuvieron los espectros de PMVEMA-Ac 20 % como nanofibras, L-Trip como polvo y PMVEMA-Ac 20 % con L-Trp 3,75 % como nanofibras (Figura 14).

Respecto al espectro de L-Trip (color negro) destacar que tiene un pico intenso a 3400 cm^{-1} correspondiente a la tensión del grupo -NH del indol y dos bandas a 1668 cm^{-1} y 1595 cm^{-1} que coinciden con el estiramiento asimétrico de los grupos COO^- y NH_3^+ ⁽²⁷⁾. Por último, los picos a 1456 cm^{-1} , 1414 cm^{-1} y 1356 cm^{-1} se

relacionan con el estiramiento simétrico de tensión y flexión de los grupos NH_3^+ , COO^- y CH respectivamente ⁽²⁶⁾.

En cuanto al espectro de PVEMA-Ac 20 % con L-Trp al 10 %, observamos que obtenemos un espectro similar al de solo PMVEMA-Ac 20 %, sin embargo, los picos correspondientes al grupo ácido carboxílico destacan con una mayor intensidad, hecho que nos hace indicar que posiblemente nuestro metabolito se encuentre encapsulado en las nanofibras.

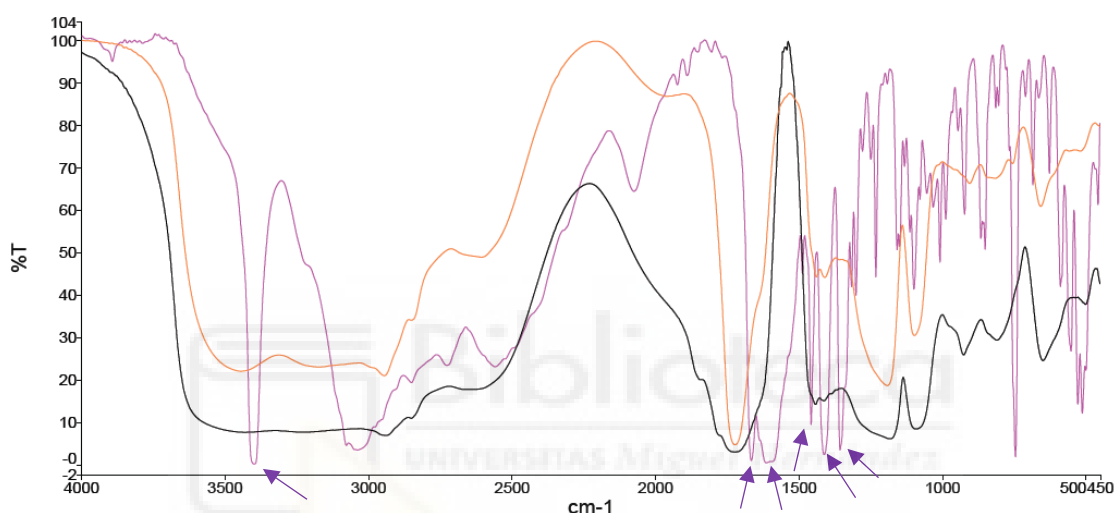


Figura 14 Espectro de infrarrojo de nanofibras de PMVEMA-Ac 20 %, color negro, L-Trip, color morado, y PMVEMA-Ac 20 % con L-Trp 3,75%, color naranja.

4.5 Evaluación cuantitativa de los metabolitos mediante ensayos de celdas de Franz

Estos ensayos permitieron confirmar la presencia tanto de cada uno de los metabolitos en los stocks de nanofibras empleados en los ensayos de celdas de Franz, así como de los metabolitos en la celda receptora del ensayo preliminar de liberación.

La cantidad de metabolito (OLAC y Trp) incorporado en las fibras poliméricas se cuantificó mediante HPLC y se pudo comprobar su valor obtenido (>100 %) por lo que su contenido teórico se puede ajustar en las medidas del ensayo de Franz. Sin embargo, en la cuantificación de las muestras de las celdas receptoras del ensayo de liberación se obtuvo que, a pesar de que los metabolitos sí fueron

detectados, estaban fuera del límite de cuantificación, por lo que no se pudo obtener la concentración de los metabolitos a los diferentes tiempos. Así, tampoco se pudo evaluar la cinética de la liberación de los ensayos. Se observó que sobre las membranas se había secado el velo de ambos metabolitos. Esto fue más evidente en el caso del L-Trp, ya que se vio un sólido seco de color anaranjado (Figura 15), lo que pudo haber causado que los metabolitos no pudieran liberarse desde las nanofibras.

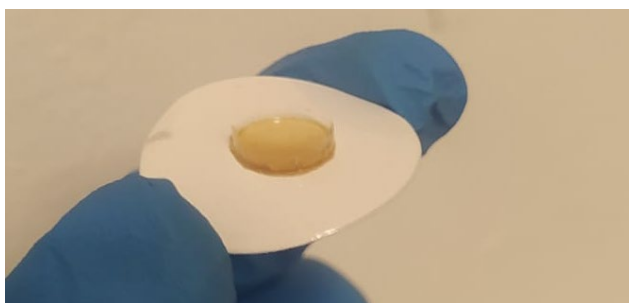


Figura 15 Fotografía representativa del PMVEMA-Ac con L-Trp seco y solidificado depositado sobre una membrana tras 24 horas del ensayo

Una posible solución a este problema podría haber sido aumentar la cantidad de metabolito en la cámara dadora, sin embargo, debido a limitaciones de solubilidad no fue posible en ninguno de los dos casos. En consecuencia, se sugiere que en ensayos futuros se aumente la cantidad de velo en la cámara dadora para garantizar la disponibilidad de los metabolitos. Además, se aconseja que se incremente la cantidad de agua añadida sobre las fibras o que esta se añada paulatinamente con el tiempo, imitando el proceso de sudoración de la piel, lo cual permitiría la salida de los metabolitos ⁽²¹⁾.

Entre las diferentes estrategias posibles, se optó por determinar la cantidad de metabolito que se quedó en la membrana para posteriormente calcular la cantidad que atravesó la misma. Se obtuvieron las rectas de calibrado correspondientes a los compuestos patrón L-Trp (Figura 16) y OALC (Figura 17), recogidas en la Tabla 3, con diferentes concentraciones con respecto a la cuantificación anterior, con el fin de poder cuantificarlos.

Tabla 2 Análisis de las rectas de calibrado de los compuestos patrón

Metabolito	Ecuación de la recta	R ²
L-Trp	Área = 48,914,024,279*Concentración + 469,110	0.9978
OALC	Área= 82,816,813,930*Concentración + 11,421,360	0.9999

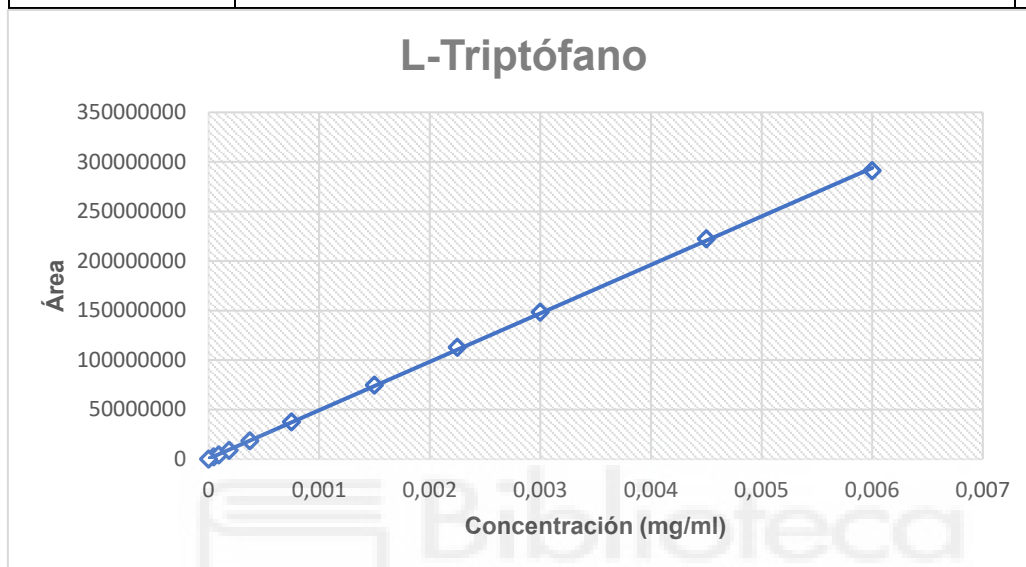


Figura 16 Recta de calibrado para L-Triptófano.

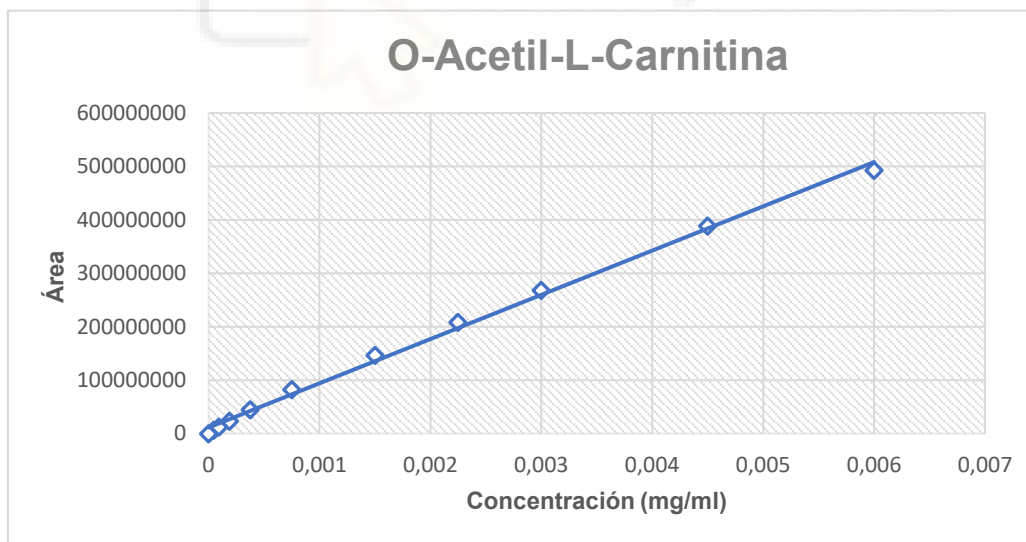


Figura 17 Recta de calibrado para O-Acetil-L-Carnitina.

Se calcularon las concentraciones de las disoluciones provenientes de las membranas y se calculó así los miligramos que quedaban sobre las membranas. Posteriormente, teniendo en cuenta los miligramos teóricos que se pusieron

sobre la cámara dadora y los miligramos obtenidos de compuesto que quedaron sobre la membrana, se calculó el porcentaje de compuesto que no había atravesado la membrana. La media obtenida para las 3 celdas de OALC fue de $65 \pm 7 \%$ y para las 3 celdas de L-Trp de $63 \pm 5 \%$. Por lo tanto, se estima que entorno al **35 %** de OALC y L-Trp ha atravesado la membrana, esto sería una cantidad baja comparado con formulaciones disponibles en el mercado, como es por ejemplo el fentanilo en parches transdérmicos⁽²⁸⁾



5. CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo se han explorado diferentes aspectos relacionados con la encapsulación de metabolitos mediante la síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac con OALC y L-Trp. Las conclusiones específicas de este trabajo son las siguientes:

- Los parámetros óptimos de electrohilado para las disoluciones de PMVEMA-Ac con OALC y L-Trp fueron 16 kV de voltaje, 0,25ml/h de flujo y 10 cm de distancia al colector.
- Se obtuvieron nanofibras homogéneas sin defectos visibles con un diámetro promedio de 367 ± 43 nm para las nanofibras con OALC y de 487 ± 104 nm para las de L-Trp.
- Se evaluó cualitativamente la encapsulación de OALC y L-Trp en poli (metil vinil éter-alt-ácido maléico) mediante espectroscopía infrarroja dando un incremento de la intensidad en determinadas frecuencias, lo que pudo sugerir la presencia de metabolitos en velo. Sin embargo, se requirió de HPLC para confirmar su presencia.
- Se evaluó cuantitativamente la encapsulación de los metabolitos mediante HPLC, sin embargo, no se pudo determinar la cinética de liberación debido a su baja concentración. Como alternativa, se calculó la concentración que no atravesó la membrana y se determinó la cantidad que la atravesó, que fue alrededor del 35 %.

En resumen, este trabajo contribuye al avance en el campo de la encapsulación de metabolitos y la formulación de parches transdérmicos, sentando las bases para futuras investigaciones y aplicaciones clínicas. Futuras investigaciones podrían centrarse en profundizar en el desarrollo de técnicas de caracterización más avanzadas para evaluar la eficacia y estabilidad de los parches transdérmicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Le J. Drug administration San Diego: MSD MANUAL; 2022 [updated 1 septiembre 2022]. Available from: <https://www.msmanuals.com/home/drugs/administration-and-kinetics-of-drugs/drug-administration>.
2. Flórez Beledo J ASJ, Mediavilla Martínez Á. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. Farmacología Humana. Barcelona: MASSON; 1997. p. 47-72.
3. Shi Y, Li Y, Wu J, Wang W, Dong A, Zhang J. A novel transdermal drug delivery system based on self-adhesive Janus nanofibrous film with high breathability and monodirectional water-penetration. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2014;25(7):713-28.
4. Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. Nature Reviews Drug Discovery. 2004;3(2):115-24.
5. Mazari SA, Mubarak NM, Jatoi AS, Abro R, Shah A, Shah AK, et al. Chapter 18 - Environmental impact of using nanomaterials in textiles. In: Ehrmann A, Nguyen TA, Nguyen Tri P, editors. Nanosensors and Nanodevices for Smart Multifunctional Textiles: Elsevier; 2021. p. 321-42.
6. Falco A, Mallavia R. Electrospun Nanomaterials: Applications in Food, Environmental Remediation, and Bioengineering. Nanomaterials [Internet]. 2020; 10(9).
7. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnology Advances. 2010;28(3):325-47.
8. Liu H, Bai Y, Huang C, Wang Y, Ji Y, Du Y, et al. Recent Progress of Electrospun Herbal Medicine Nanofibers. Biomolecules. 2023;13(1).
9. Tiwari SK, Venkatraman SS. Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. Materials Science and Engineering: C. 2012;32(5):1037-42.
10. Wu T, Ding M, Shi C, Qiao Y, Wang P, Qiao R, et al. Resorbable polymer electrospun nanofibers: History, shapes and application for tissue engineering. Chinese Chemical Letters. 2020;31(3):617-25.
11. Mira A, Mateo CR, Mallavia R, Falco A. Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers. Scientific Reports. 2017;7(1):17205.
12. Castaneda PS, Dominguez Delgado CL, Cruz IMR, Contreras LMM, Trinidad EMM, Cervantes ML, et al. Development of Poly (Methyl vinyl ether-alt-maleic acid) Microneedles for Transdermal Delivery of Atorvastatin Calcium. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2020;21(9):852-61.
13. Martínez-Ortega L, Mira A, Fernandez-Carvajal A, Mateo CR, Mallavia R, Falco A. Development of A New Delivery System Based on Drug-Loadable Electrospun Nanofibers for Psoriasis Treatment. Pharmaceutics. 2019; 11(1).
14. Zhou N, Ma X, Hu W, Ren P, Zhao Y, Zhang T. Effect of RGD content in poly(ethylene glycol)-crosslinked poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) hydrogels on the expansion of ovarian cancer stem-like cells. Materials Science and Engineering: C. 2021;118:111477.
15. Hashemzadei M, Fanoudi S, Rezaei H, Musavi SS, Belaran M, Rezaee S, et al. Evaluation of the effect of nicotine and O-acetyl-L-carnitine on testosterone-

induced spatial learning impairment in Morris water maze and assessment of protein markers. *Learning and Motivation*. 2022;78:101810.

16. Li S, Li Q, Li Y, Hou Q, Li L, Yu C, et al. Acetyl-L-Carnitine for the Treatment of Peripheral Neuropathic Pain: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Value Health*. 2014;17(7):A810.

17. Kazak F, Yarim GF. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice: Involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letters*. 2017;658:32-6.

18. Altun Z, Olgun Y, Ercetin P, Aktas S, Kirkim G, Serbetcioglu B, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-related genes and pro-inflammatory cytokines. *Cell Proliferation*. 2014;47(1):72-80.

19. Stefan RI, Bokretsiun RG, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Biosensors for the determination of ortho-acetyl-L-carnitine. Their utilization as detectors in a sequential injection analysis system. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2003;33(3):163-72.

20. Sandyk R. L-Tryptophan in Neuropsychiatry Disorders: A Review. *International Journal of Neuroscience*. 1992;67(1-4):127-44.

21. Ng S-F, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *American Association of Pharmaceutical Scientist PharmSciTech*. 2010;11(3):1432-41.

22. Amariei N, Manea LR, Berteza AP, Berteza A, Popa A. The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2017;209(1):012092.

23. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews*. 2019;119(8):5298-415.

24. Varshosaz J, Jahanian A, Maktoobian M. Montelukast incorporated poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) electrospun nanofibers for wound dressing. *Fibers and Polymers*. 2017;18(11):2125-34.

25. Stuart B. Infrared Spectroscopy. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 2015. p. 1-18.

26. Hesse M MH, Zeeh B. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Vallehermoso, Madrid: Editorial síntesis; 1999. 377 p.

27. Ivanova BB. IR-LD spectroscopic characterization of L-Tryptophan containing dipeptides. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006;64(4):931-8.

28. Varvel JR, Shafer SL, Hwang SS, Coen PA, Stanski DR. Absorption characteristics of transdermally administered fentanyl. *Anesthesiology*. 1989;70(6):928-34.