
TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS
EN UN APÓSITO PARA EL TRATAMIENTO DE
PSORIASIS**

Autora

Leticia Martínez Ortega

Tutor/Cotutor

Ricardo Mallavia Marín/Juan Alberto Falcó Gracia

Área de Química Inorgánica

Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2017/2018

Elche, junio de 2018

Resumen

La psoriasis es una enfermedad cutánea con una incidencia aproximada del 2% a nivel mundial y caracterizada por lesiones escamosas que cursan con dolor, escozor y sangrado, asociado a una inflamación característica. Para el tratamiento paliativo de los síntomas de esta enfermedad, en este trabajo, se ha empleado la nanotecnología para diseñar, en forma de apósito, nanofibras poliméricas de monoetil éster de poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-ES) como vehículo de tres agentes terapéuticos (capsaicina, salicilato de metilo y ácido salicílico). Con este fin, se ha utilizado la técnica de electrohilatura. Para ello, se ha optimizado la formación de fibras poliméricas mediante este proceso, las cuales se caracterizaron mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM, *Scanning electron microscopy*). Se seleccionaron como condiciones óptimas aquellas que permitieron producir nanofibras con diámetros aproximados de 800-900 nm. Mediante este procedimiento, los terapéuticos utilizados fueron encapsulados eficientemente y no se detectaron pérdidas significativas de los compuestos encapsulados (salvo de salicilato de metilo) durante 15 días tras su elaboración como muestran los resultados de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Asimismo, se comprobó que estos compuestos conservan e incluso mejoran su capacidad de activación del canal TRPV1 (sistema celular HEK293-VR1(RT)) cuando están incorporados en las nanofibras. Ensayos preliminares con voluntarios mostraron la aplicabilidad y funcionamiento correcto de este sistema en el formato de apósito.

Palabras clave: Psoriasis, nanofibras, PMVEMA-ES, Capsaicina, Salicílico, Salicilato.

Abstract

*Psoriasis is a skin disease with an approximate incidence of 2% worldwide and characterized by squamous lesions with pain, stinging and bleeding, associated with characteristic inflammation. For the palliative treatment of the symptoms of this disease, in this work, nanotechnology has been used to design, in a dressing form, polymeric nanofibers of poly (methyl vinyl ether-*alt*-maleic acid) monoethyl ester (PMVEMA-ES) as vehicle of three therapeutic agents (capsaicin, methyl salicylate and salicylic acid). To this end, the electrospinning technique has been used. For this, the formation of polymeric fibers by this process has been optimized, and they were characterized by optical and scanning electron microscopy (SEM). Settings allowing the production of nanofibers with approximate diameters of 800-900 nm were selected. By this procedure, the therapeutics used were efficiently encapsulated and no significant losses of the encapsulated compounds were detected (except for methyl salicylate) during 15 days after their elaboration, as shown by the results of gas chromatography and mass spectrometry. Likewise, it was found that these compounds conserve and even improve their activation capacity of the TRPV1 channel (cellular system HEK293-VR1 (RT)) when they are incorporated into the nanofibers. Preliminary trials with volunteers showed the applicability and correct functioning of this system in the dressing format.*

Keywords: Psoriasis, nanofibers, PMVEMA-ES, Capsaicin, Salicylic, Salicylate.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Psoriasis	1
1.2. Agentes terapéuticos	3
1.2.1. Agente queratolítico: Acido salicílico	3
1.2.2. Agente analgésico: Salicilato de metilo	4
1.2.3. Agente analgésico: Capsaicina	4
1.3. Nanotecnología y nanofibras	4
2. Antecedentes y objetivos	5
3. Materiales y métodos	6
3.1. Materiales	6
3.1.1. Polímero transportador	6
3.1.2. Reactivos químicos	7
3.1.3. Síntesis química del salicilato de metilo	8
3.2. Instrumentación y metodología	8
3.2.1. Nanofibras de PMVEMA-ES mediante electrohilatura	8
3.2.2. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)	11
3.2.3. Ensayos <i>in vitro</i> celulares	13
3.2.4. Desarrollo y estudio <i>in vivo</i> de un apósito nanofibroso	15
4. Resultados	16
4.1. Optimización de las nanofibras poliméricas mediante parámetros operacionales	16
4.1.1. Sin agentes terapéuticos	16
4.1.2. Con agentes terapéuticos	19
4.2. Estudio de la microscopía electrónica de barrido (SEM)	20
4.3. Estudio de estabilidad en el tiempo en la fibra y disolución polimérica por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas	21
4.3.1. Resultados del ensayo de estabilidad	22
4.4. Ensayos <i>in vitro</i> con la línea celular HEK293-VR1 (RT)	24
4.5. Ensayos preliminares en voluntarios del apósito nanofibroso	27
5. Discusión	28
6. Conclusiones y proyección futura	31
7. Bibliografía	31

1. Introducción

1.1. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad cutánea de origen probablemente autoinmune [3], crónica, no contagiosa y con remisiones caracterizada clínicamente por la presencia de pápulas y placas eritematosas cubiertas por una descamación plateada [4]. Además de este tipo de lesiones, la enfermedad cursa con dolor, escozor y sangrado, asociado a la inflamación característica [3]. Las zonas más afectadas son codos, rodillas, cuero cabelludo y zona lumbar, aunque pueden afectar a cualquier parte del cuerpo.

Afecta a un 2% aproximadamente de la población mundial, heterogéneamente y de diferentes formas clínicas [5]. En nuestro país, España, la prevalencia es de 1,4%, siendo más común en las regiones centrales y secas del país [6]. La enfermedad afecta de forma semejante a hombres que mujeres y se puede iniciar a cualquier edad, desde los primeros meses hasta después de los ochenta años, siendo los dos picos de incidencia entre los 20-30 años y 50-60 años [7]. Las comorbilidades más frecuentes son las enfermedades vasculares, riesgo de sufrir melanomas y otros tumores cutáneos, además de la esteatosis hepática no alcohólica [8]. Y todo ello unido a los problemas psicológicos/psiquiátricos, produciéndose rechazo social, vergüenza, problemas sexuales, deterioro de la capacidad profesional y disminución de la autoestima. En casos más graves, pueden causar depresión y ansiedad [9].

La etiopatogenia es desconocida, pero se conocen los factores desencadenantes de la enfermedad pudiendo variar según los casos.

- Factor genético: Se trata de una herencia multifactorial o autosómica dominante de baja penetrancia [5]. El gen más relevante de esta enfermedad es el antígeno leucocitario humano, HLA-Cw6, localizado en la región PSORS1 y su presencia multiplica por 10 la posibilidad de tener psoriasis [10].
- Factores ambientales: Son muy variados desde traumatismos con la aparición del fenómeno Koebner (aparición de lesiones en áreas de traumatismos) [9], infecciones bacterianas o víricas hasta fármacos como corticoides, interferón, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o exposición a sales de litio [5]. Hábitos como la toma de alcohol, fumar tabaco o tener obesidad influyen pero el que cobra especial importancia es el estrés psíquico, siendo identificado por muchos pacientes como el principal responsable [11].

Teniendo en cuenta los factores anteriores, podemos diferenciar dos grandes grupos clínicos [12]:

- Psoriasis tipo I: Pacientes menores de 40 años, con antecedentes familiares y en los que se evidencia la presencia del alelo HLA-Cw6. Un inicio precoz se asocia con frecuencia a antecedentes familiares y peor evolución [13].
- Psoriasis tipo II: Pacientes mayores de 40 años y sin antecedentes familiares.

No se trata de una clasificación rígida, existen pacientes que no se enmarca en un determinado tipo [14].

Hay distintos tipos de psoriasis según las formas clínicas en las que se presenten [5] [9]:

- Psoriasis en placas o vulgar: más frecuente, 90% [15]. Se caracteriza por placas rojas de pocos milímetros hasta varios centímetros. Aparece en rodillas, codos y zona lumbar.
- Psoriasis en gotas o guttata: Frecuencia de 1.9%, en edades tempranas, con pápulas de 0,5-1,5 cm en brotes de 2-3 meses. Aparecen en la región superior del tronco y proximal a las extremidades.
- Psoriasis en las palmas y plantas: La piel se agrieta, sangra y produce dolencia. La afectación plantar puede producir problemas de movilidad.
- Psoriasis en el cuero cabelludo (sebopsoriasis): muy frecuente, 50-80%. Los síntomas son los mismos que la de en placas con descamación sobre una zona roja inflamada. Suele producir mucho picor.
- Psoriasis en uñas (ungueal): Muy variable y se puede asociar con cualquier tipo de psoriasis.
- Psoriasis en cara: Poco frecuente y difícil de tratar al producir irritación con afectación en la vida personal y profesional. Es común confundirla con dermatitis seborreica.
- Psoriasis de los pliegues o invertida: Placas más rojas y menos descamativas y afecta a los pliegues cutáneos.
- Psoriasis eritrodérmica: Afecta a casi toda la superficie cutánea. Piel muy roja, caliente y se descama abundantemente. Suele requerir ingreso hospitalario.
- Psoriasis pustulosa: Frecuencia menor del 5%, grave y poco habitual. Aparecen pústulas (protuberancias llenas de pus) sobre las placas.

Otro tipo derivado de la psoriasis es la artritis psoriásica con la inflamación de algunas articulaciones.

Los tratamientos de la psoriasis pueden hacer desaparecer las lesiones u ocasionar gran mejoría, pero no existe un tratamiento que cure de forma definitiva. Podemos clasificar los tratamiento en terapia clásica en la cual incluimos los tratamientos tópicos, fototerapia y algunos sistémicos, y por otro lado, los tratamientos biológicos, más dirigidos y actualmente en auge [16].

- Tratamientos tópicos [9].
- Fototerapia [16]
- Tratamientos sistémicos [16]

A diferencia de los anteriores, los tratamientos biológicos ofrecen nuevas opciones terapéuticas más selectivas minimizando los efectos secundarios y siendo a largo plazo. No producen toxicidad y no interaccionan con otros medicamentos. Pero tienen limitaciones como, por ejemplo, su elevado coste, pérdida de eficacia ante aparición de anticuerpos frente al producto biológico, la predisposición a infecciones como tuberculosis, riesgo de aparición de linfomas y enfermedades autoinmunes. Además,

deben de ser conservados en nevera, sin romper la cadena de frío, y se desconocen los efectos a largo plazo.

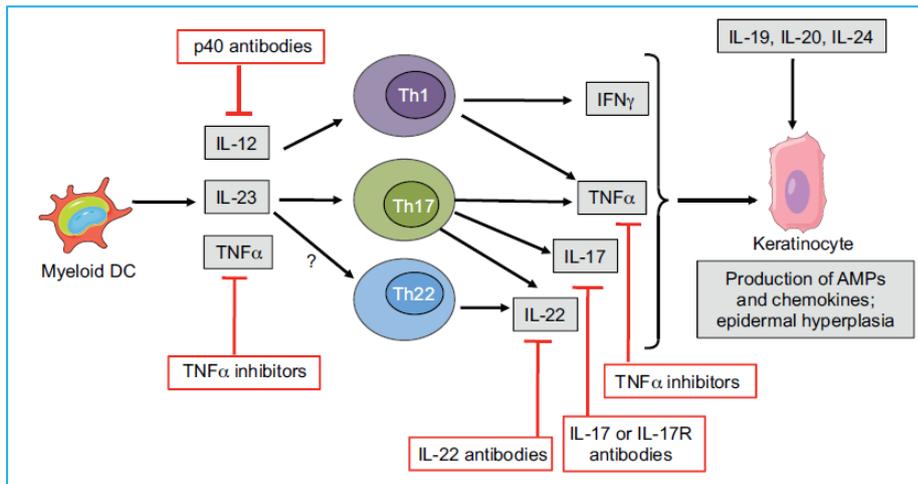


Figura 2: Esquema modelo de las dianas terapéuticas aprobadas para el tratamiento de psoriasis.

Fuente: *Disease models & mechanisms* [2].

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado un apósito de nanofibras poliméricas mediante el uso de la nanotecnología para el tratamiento paliativo de la psoriasis de forma tópica con tres agentes terapéuticos, que a continuación vamos a tratar de manera individual.

1.2. Agentes terapéuticos

Los tres agentes descritos son una aproximación que sirven para paliar el dolor y escozor de la psoriasis vulgar, *gutatta* o en palmares y plantares con analgésicos, además de evitar la formación de más escamas, favoreciendo su degradación. Primeramente, se hablará del agente que disminuye las escamas. Posteriormente de los otros agentes analgésicos.

1.2.1. Agente queratolítico: Acido salicílico

El ácido salicílico es un agente queratolítico [17] que disminuye el pH del estrato corneo y de esta forma evita la adhesión de los queratinocitos. Se reblandecen las escamas y posteriormente se caen para ser eliminadas. Además, produce mejor absorción de otros tratamientos tópicos al reducir la rigidez del estrato, con lo que se suele usar en asociación. Adicionalmente, reduce el prurito [18] y a concentraciones mayores o iguales a 0,3% p/v posee actividad bactericida y bacteriostática de bacterias Gram negativas y positivas [19]. El efecto secundario es un fallo hepático o renal al tener una absorción sistémica este agente, pero esto en caso de que haya más de un 20% de la superficie corporal tratada en adultos y un 10% en niños. Es útil para la psoriasis del cuero cabelludo en forma de champú o lociones. Se usa en concentraciones variables entre el 0,5 y 60% p/p [19].

1.2.2. Agente analgésico: Salicilato de metilo

El salicilato de metilo es un derivado del ácido salicílico y posee la ventaja de ser absorbido fácilmente a través de la piel, estimulando el flujo sanguíneo de los capilares. Se reconoce como antiinflamatorio no esteroideo (NSAIDs) utilizado para el tratamiento de la inflamación y dolor en una amplia gama de trastornos [20]. Este tipo se basan en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas causado por la acción sobre las ciclooxigenasas (COX), aunque se ha demostrado que también actúan por otra ruta diferente como la de los canales TRPV1 [21]. Este agente al igual que el anterior tiene efecto antiséptico y se utiliza frecuentemente en colutorios bucales.

1.2.3. Agente analgésico: Capsaicina

La capsaicina es un alcaloide extraído de los pimientos rojos picantes [22]. Este agente tiene numerosas funciones biológicas, por ejemplo, estimulador del sistema cardiovascular, analgésico, antioxidante, anticarcinógeno, antiinflamatorio [23], bactericida ante *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, antiparasitario y antifúngico. La capsaicina actúa como agonista nociceptor cutáneo provocándoles una sobreestimulación a los canales TRPV1, comúnmente llamados receptores de capsaicina, que produce dolor [24]. Esta los desensibiliza y los incapacita para responder a los estímulos que provocan dolor. Los canales TRPV1 son tetrámeros [25] que se encuentran en mamíferos y se activan además de por capsaicina, por temperatura mayor o igual a 42°C, pH ácido y algunos mediadores endógenos de la inflamación [26].

A pesar de mostrar efectos analgésicos [27], también tiene efectos secundarios debido a la activación inicial como ardor, prurito, irritación, incluso es cancerígena si la aplicas de forma continuada [28]. Su papel en la psoriasis se centra en que es un bloqueador de TNF- α e inhibe el mediador de la psoriasis, NF-kB en células epidérmicas [29].

1.3. Nanotecnología y nanofibras

La nanotecnología es una ciencia que se dedica al diseño y manipulación a escala nanométrica. Las nanofibras poliméricas se caracterizan por presentar un diámetro inferior a 1 μm . Su tamaño les confiere una elevada relación superficie/volumen, alta porosidad y un pequeño tamaño de poro, lo que se traduce en una mejora enorme de las propiedades mecánicas de dichas fibras respecto a las que tienen diámetros mayores. Por otro lado, las nanofibras son de interés en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas tópicas en forma de apósitos, parches transdérmicos o implantes degradables [30].

En una búsqueda reciente en la base de datos *Web Of Science* (WOS), podemos encontrar que el número de publicaciones con la palabra *nanofiber*, nanofibra en español, ha aumentado considerablemente a lo largo de estos años, más o menos de forma exponencial uniforme.

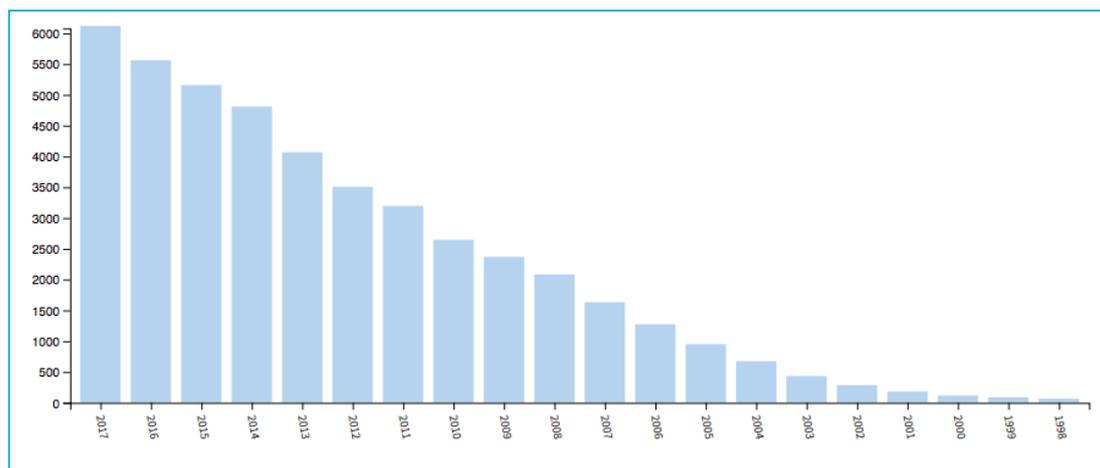


Figura 3: Número de publicaciones con la palabra *nanofiber* desde 1998 hasta 2017. Fuente: Web Of Science.

Los polímeros empleados en las disoluciones a electrohilar han sido ampliamente utilizados en medicina y biotecnología [31] como dispositivos quirúrgicos [32], implantes [33], sistemas de administración de fármacos de liberación controlada [34] o dirigida, portadores de enzimas y células inmovilizadas, biosensores [35], bioadhesivos, dispositivos oculares, materiales dentales [36], de modificación de superficie [37], componentes de las pruebas de diagnóstico, adhesivos tisulares [38] y materiales para aplicaciones de ingeniería de tejidos y ortopedia [39] [40]. Dicha versatilidad en diferentes campos requiere numerosas composiciones y adecuadas propiedades para satisfacer toda la demanda anterior. Las principales ventajas de los materiales poliméricos son la facilidad de preparación en distintas formas, biodegradabilidad, precio razonable y disponibilidad de propiedades mecánicas y físicas deseadas.

2. Antecedentes y objetivos

Las referencias a la nanotecnología no llegaron hasta 1959 con el físico Richard Feynmann en una conferencia [41] en la cual vislumbró la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular. Pero no fue hasta 1974 cuando Norio Taniguchi utilizó por primera vez el término nanotecnología [42]. La nanotecnología es un campo actualmente en auge gracias a las soluciones que ofrece tanto en el desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas como para la mejora de las convencionales [43]. Las múltiples posibilidades de diseño, tanto en tamaño como estructura, la convierten en una herramienta muy versátil con potencial para su uso en diferentes aplicaciones y con capacidad de ser incorporada en casi cualquier dispositivo biomédico [44]. Una de las aplicaciones de este campo es la nanoencapsulación, siendo esta una protección de los agentes encapsulados frente a degradaciones ambientales y como vehículo para ser dirigido a su diana específica [45]. Esto es una ventaja ya que se pueden disminuir los efectos secundarios y la dosis aplicada. Los materiales transportadores de dicho contenido son los polímeros en su gran mayoría, ya que son muchos de ellos

biocompatibles, biodegradables, abarcan moléculas terapéuticas en su interior y tratamientos relevantes durante periodos prolongados [46]. Estudios previos demuestran el uso de las nanotecnología con eficacia para el tratamiento de psoriasis, encapsulando en su interior capsaicina [47] o ácido salicílico [48]. No hay datos de encapsulación ni de uso del salicilato de metilo en ningún sistema nanoestructurado ni de los tres encapsulados con dicho fin.

Los principales sistemas nanoestructurados son nanopartículas y nanofibras, siendo esta última útil en su aplicación de apósito [49]. Para sintetizar tales nanofibras hay distintas técnicas, pero el electrohilado o *electrospinning* es el más utilizado. El tamaño de las nanofibras es modulable mediante controles operacionales de la técnica, además de haber demostrado tener alta capacidad de carga y encapsulación en su interior [50]. Los polímeros seleccionados como base de estas nanoestructuras han sido los copolímeros del anhídrido maleico y el metil vinil éter y sus derivados. Destacan por ser moléculas biodegradables, altamente compatibles, adhesivas y con baja toxicidad [51] [52]. En otros trabajos ya descritos externos a nuestro laboratorio, se ha realizado la encapsulación de agentes farmacéuticos en nanopartículas de este polímero [53] y nanofibras con alta capacidad de carga [54]. Los trabajos más destacados con el uso de estos copolímeros en nuestro laboratorio han sido la realización de nanofibras y nanopartículas encapsuladas con agentes terapéuticos como 5-ALA (ácido 5-aminolevulínico), antibióticos y polifluorenos [55] [56] [57], hasta la fecha.

En este contexto, se fijan los **objetivos del trabajo**:

El objetivo global de este Trabajo Fin de Grado se basa en el diseño y realización de un apósito con fibras poliméricas y contenido terapéutico para el tratamiento paliativo de psoriasis.

Para la consecución del objetivo global han de realizarse los objetivos específicos del estudio:

- Optimización de los parámetros operacionales de la tecnología de la electrohilatura para el diseño adecuado de sistemas nanoestructurados encapsulados de contenido terapéutico.
- Medición de la estabilidad de las fibras encapsuladas durante 15 días.
- Comprobación experimental de la funcionalidad y actividad de las nanofibras con su contenido terapéutico en ensayos *in vitro*, y en ensayos preliminares en voluntarios.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Polímero transportador

El material polimérico biocompatible para la elaboración de nanofibras en este Trabajo Fin de Grado fue un copolímero del monoetil éter de poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-ES), polímero utilizado en este trabajo, $M_w = 130,000$ g/mol (calculados por dispersión de luz), $d=0,983$ g/mL (25°C), suministrada al 50% p/p en etanol. Este polímero sólo es soluble en etanol y parcialmente en

agua. Fue adquirido en Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos). Está aprobado por la FDA para el uso en higiene bucal y en parches transdérmicos. Es biocompatible con propiedades adhesivas y biodegradable, apto para el uso tópico.

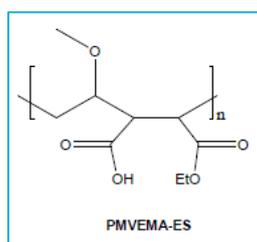


Figura 4 : Estructura química del copolímero utilizado para la fabricación de nanofibras.

3.1.2. Reactivos químicos

Los disolventes se emplearon tal y como se recibieron siendo la gran mayoría de este trabajo de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos), excepto los citados aquí y posteriormente:

- Diclorometano (CH_2Cl_2): Mw: 84,93 g/mol, calidad HPLC, $\geq 99,8\%$ y contiene amileno como estabilizador.
- Acetona (CH_3COCH_3): Mw: 58,08 g/mol, cumple con las especificaciones analíticas de Ph. Eur., BP, NF $\geq 99\%$ (GC).
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): Mw: 46,07 g/mol, calidad de espectroscopia $\geq 99,9\%$. Adquirido en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).
- Metanol (CH_3OH): Mw: 32,04 g/mol, calidad HPLC $\geq 99,8\%$. Adquirido en VWR International (Radnor, Pensilvania, Estados Unidos).

Los productos químicos se emplearon tal y como se recibieron siendo la gran mayoría de este trabajo de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos), excepto los citados aquí y posteriormente:

- Ácido salicílico (2-(HO) $\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$): Mw: 138,12 g/mol, pureza $\geq 99,0\%$ (T). Soluble en etanol y DMSO.
- Capsaicina ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CONHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3-4-(\text{OH})-3-(\text{OCH}_3)$): Mw: 305,41 g/mol, es un estándar secundario farmacéutico trazable a USP, PhEur. Pureza 61,1% de capsaicina y 31,2% de dihidrocapsaicina según certificado de análisis de Sigma-Aldrich. Soluble en etanol y DMSO.
- Sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4): Mw: 120,37 g/mol, pureza $\geq 98\%$ (KT) Adquirido en Honeywell Fluka (Morris Plains, Nueva Jersey, Estados Unidos).
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4): Mw: 98,08 g/mol, pureza 95-97% (T).
- Hidróxido de sodio en forma de lentejas (NaOH): Mw: 40,00 g/mol, pureza $\geq 98\%$. Adquirido en Panreac AppliChem – ITW Reagents (Cinisello Balsamo, Milán, Italia).
- Cloruro férrico (FeCl_3): Mw: 162,2 g/mol, pureza 97%.
- Salicilato de metilo. Realización propia, ver a continuación.

3.1.3. Síntesis química del salicilato de metilo

Se realizó una síntesis química a partir del ácido salicílico de una pureza mayor del 99% y metanol, realizando con ello una esterificación del ácido y convirtiéndolo en un éster. Es una sustitución nucleofílica al grupo carbonilo. La velocidad a la que se esterifica el ácido carboxílico depende principalmente del impedimento estérico en el alcohol y el ácido carboxílico, y en menor medida de la fuerza ácida del ácido carboxílico. El método de síntesis química utilizado fue el propuesto por Carrillo-Arcos [58].

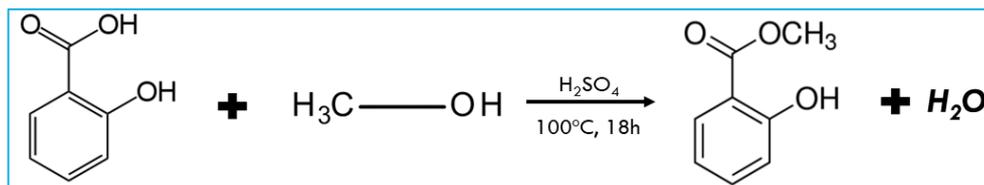


Figura 5: Síntesis química del salicilato de metilo.

Se disolvieron 28,96 mmoles de ácido salicílico en 60 ml de metanol en un matraz de fondo redondo, y 2 mL de ácido sulfúrico fueron añadidos a la solución gota a gota. La mezcla de reacción fue agitada a 300 rpm y calentada bajo reflujo 18 horas hasta 100°C.

Pasado este tiempo, se enfría la mezcla hasta 25°C y se evapora el metanol bajo vacío en el rotavapor (Büchi R-210, Flawil, Suiza). El residuo final se diluye en 50 mL de agua y a pH 5-6 para precipitar el salicilato de metilo. A continuación, se realizaron extracciones con diclorometano (3 x 150 mL) y el residuo viscoso se elimina a sequedad evaporando todo el disolvente. Finalmente, el salicilato de metilo se purifica por destilación a vacío en horno de bolas (Büchi B-585, Flawil, Suiza), obteniéndose un líquido transparente con un rendimiento neto del 75%.

3.2. Instrumentación y metodología

3.2.1. Nanofibras de PMVEA-ES mediante electrohilatura

El inicio de la electrohilatura se sitúa en la década de 1930 mediante las contribuciones de Anton Formhals y no es hasta 1990 cuando se populariza el nombre de la técnica y se electrohilan muchos polímeros orgánicos [59]. El electrohilado o *electrospinning* tiene varias ventajas, entre las cuales destaca ser un método de bajo coste con equipamiento sencillo, versatilidad, sencillez, facilidad de implantación y la posibilidad de escalarlo a nivel industrial. Mediante esta técnica se pueden elaborar nanofibras poliméricas que contengan agentes terapéuticos con alta eficiencia de encapsulación y que presenten cinéticas de liberación inmediata o sostenida en días o semanas [60].

3.2.1.1. Preparación de disoluciones poliméricas estándar y con agentes encapsulados

Inicialmente, se pretendió optimizar la síntesis de nanofibras de PMVEA-ES. Uno de los parámetros es la concentración de este polímero en soluciones a electrohilar. Las concentraciones de polímero

probadas fueron del 20-28% p/p en etanol en base a la bibliografía [57]. En la elaboración, las disoluciones eran agitadas magnéticamente a 300 rpm durante 5 horas a temperatura ambiente. Para la elaboración de nanofibras con contenido terapéutico, la concentración de polímero fue del 25% p/p en etanol y se realizó como se describe anteriormente. Los agentes terapéuticos a encapsular fueron incluidos en el etanol de la disolución polimérica a la concentración de 1,5% de ácido salicílico y 1% de capsaicina y de salicilato de metilo, todas en p/p respecto al polímero.

3.2.1.2. Elaboración de nanofibras poliméricas estándares y con agentes terapéuticos mediante electrohilatura.

El electrohilado es un proceso para obtener nanofibras de forma continua de una gran cantidad de materiales y geometrías aplicando un campo electrostático elevado entre dos polos que supere la tensión superficial de la solución de polímero [61], [62]. Esta técnica produce el fenómeno del cono de Taylor (geometría cónica al final de la aguja) [63] el cual consiste en que las cargas son inducidas en el fluido durante el recorrido entre los electrodos, la tensión superficial se rompe y se descompone generando una aceleración rápida en el chorro o *jet* por la atracción de cargas. El disolvente es evaporado a medida que hace el recorrido entre la aguja y el colector.

El método habitual es introducir la disolución polimérica en una jeringa Discardit II 2 mL (Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos) y esta ser bombeada a través de una aguja de acero inoxidable 316 (Sigma-Aldrich) a un flujo determinado (mL/h) controlado por una bomba de infusión kdScientific 100. La aguja y el colector están conectadas a una fuente de alta tensión Series FC (Glassman High Voltage, INC, Nueva Jersey, Estados Unidos), que aplica el voltaje responsable de la aparición del *jet*. La evaporación del disolvente a lo largo del *jet* origina la formación de las nanofibras, que se depositan sobre el colector que se encuentra a una distancia predeterminada (Figura 6). La disposición del equipo puede ser en horizontal o vertical. En este trabajo, se ha utilizado la distribución horizontal. En horizontal, el disolvente no evaporado caerá por las paredes de la caja teniendo el inconveniente de que hay pérdidas si no toda la disolución forma fibras.

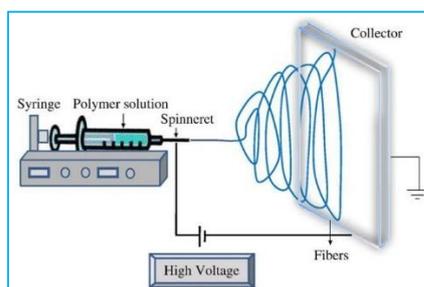


Figura 6: Esquema del electrohilado. Fuente: *Biofabrication of Tissue Scaffolds* [1].

Para el control del electrohilado, hay que tener varios parámetros en cuenta que afectan a la formación de fibras. Se clasifican en tres grupos.

Tabla 1. Control operacional y efectos del electrohilado

	Parámetros	Efecto en la morfología de la fibra
Solución polimérica	<i>Peso molecular</i>	Necesario alto peso molecular
	<i>Concentración</i>	Relacionada con la viscosidad. A concentraciones muy altas, fibras de mayor grosor. A concentraciones muy bajas, no se obtienen fibras o de forma discontinua
	<i>Conductividad</i>	Necesaria alta conductividad para favorecer la uniformidad, menor tamaño y menos defectos.
	<i>Tensión superficial</i>	Mejor baja, si es muy alta, hay inestabilidad en el haz con aparición de defectos.
Equipo	<i>Voltaje</i>	Un voltaje elevado implica mayor campo eléctrico con estrechamiento de fibra y favorece la evaporación del disolvente [64].
	<i>Velocidad de flujo</i>	A elevada velocidad no hay evaporación completa del disolvente y a bajas permite un grosor menor de las fibras [65].
	<i>Distancia colector</i>	<i>aguja-</i> Hay una distancia óptima, que mayor o menor que esta se forman aglomeraciones.
Ambiente	<i>Temperatura</i>	Afecta a la viscosidad directamente. A mayor temperatura disminuye la viscosidad y el diámetro de fibras [66].
	<i>Humedad relativa</i>	A altas humedades hay poros en las fibras [66] y reduce la aparición de defectos [64] y a bajas, el disolvente se evapora más rápido y obstruye la aguja.

Se prepararon muestras de nanofibras utilizando los portaobjetos (Deltalab, Rubí, Barcelona, España) como colectores para su posterior análisis mediante microscopía óptica, sobre el colector para los ensayos de microscopía electrónica de barrido (SEM) y directamente sobre los apósitos.

Las medidas realizadas en cada muestra ($n = 100$, Image J (Institutos Nacionales de Salud, NHI)) fueron obtenidas mediante imágenes del microscopio óptico y del microscopio electrónico de barrido (SEM) y el procesamiento de estas mediante el software Microsoft Excel.

3.2.1.3. Microscopía óptica

El microscopio óptico crea una imagen aumentada del objeto sirviéndose de la luz visible y esta tecnología se usa con el fin de caracterizar la morfología de las fibras, además de su tamaño. Este tamaño no es fiable debido al borde birrefringente observado y al tamaño reducido de las fibras. El microscopio óptico de fluorescencia invertido utilizado es Microsystems DMI3000B (Leica), equipado con una fuente de luz compacta Leica EL6000 y una cámara digital Leica DFC 3000G. Todas las muestras obtenidas mediante electrohilatura fueron analizadas mediante este tipo de microscopía,

pudiendo realizar una rápida observación y evaluación de tamaño de las fibras obtenidas y así poder tomar decisiones para optimizar los parámetros operacionales de electrohilatura. Las imágenes se realizaron a 63x en contraste de fases y el procesado de imágenes se realizó manualmente mediante el programa Leica Application Suite AF 6000 Module Systems.

Una vez tomadas las imágenes, se procesan los datos de las medidas realizadas con el software Image J (Institutos Nacionales de Salud, NHI) de las fibras mediante el software Microsoft Excel con un total de 100 medidas ($n=100$) para obtener representatividad en las muestras.

3.2.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Debido a las limitaciones del microscopio óptico [67], se decidió ver las imágenes a mayor resolución con un microscopio electrónico de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscope*). Este tipo de microscopio es un instrumento que utiliza un haz de electrones de alta energía sobre una superficie sólida, generando estos una señal en forma de imagen. El microscopio electrónico de barrido utilizado ha sido JSM-6360LV (Jeol, Japón), y las muestras fueron realizadas por el Dr. Ricardo Granja. En este tipo de microscopio se ha comprobado la morfología de las fibras y medidas experimentales más precisas determinadas con el software Image J (Institutos Nacionales de Salud, NHI) que se pueden comparar con las imágenes tomadas con el microscopio óptico mediante la realización de 100 medidas del software Microsoft Excel en ambos casos.

3.2.2. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)

El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas es una técnica que combina la capacidad de separación del cromatógrafo de muestras volátiles o semivolátiles con la sensibilidad y selectividad del masas. El equipo utilizado, GCMS-QP2010 SE con detector cuadrupolo (Shimadzu, Kioto, Japón), y además cuenta con un equipo anexo de desorción térmica TD-20 y un inyector automático de muestras, AOC-20i/s, ambos de la misma marca que el cromatógrafo.

El método llevado a cabo se basó en la bibliografía [68]. Las temperaturas de inyector y detector fueron 250°C y 210°C, respectivamente. Como gas portador, el helio fue utilizado a un caudal de 1,5 ml/min. El programa de temperatura aplicado fue el siguiente: primero se estableció una temperatura inicial de 40°C durante 2 minutos, luego la temperatura se elevó a 240°C a una velocidad de 5°C/min, y finalmente con una velocidad de 5°C/min se mantiene a la temperatura final, 270°C, durante 5 minutos.

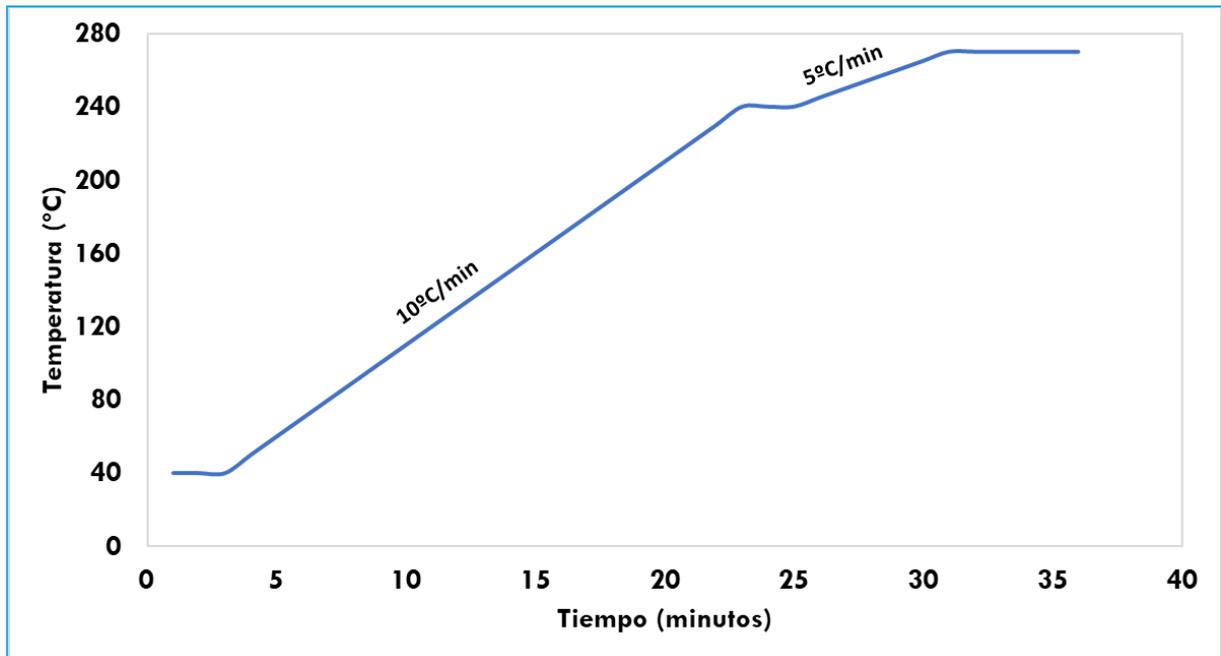


Figura 7. Rampa de temperatura utilizada en el método del CG-MS para la calibración y ensayos de estabilidad.

1- Calibración de los agentes terapéuticos

La recta de calibrado de los productos terapéuticos tomaba las concentraciones de 0,018 a 1,42 mg/mL en la capsaicina, de 0,009 a 0,72 mg/mL en la dihidrocapsaicina (derivado de la capsaicina y con un porcentaje de pureza 31,2%, con lo cual apareció en el cromatograma), de 0,04 a 3,22 mg/mL en el salicilato de metilo y de 0,161 a 3,22 a mg/mL en el ácido salicílico.

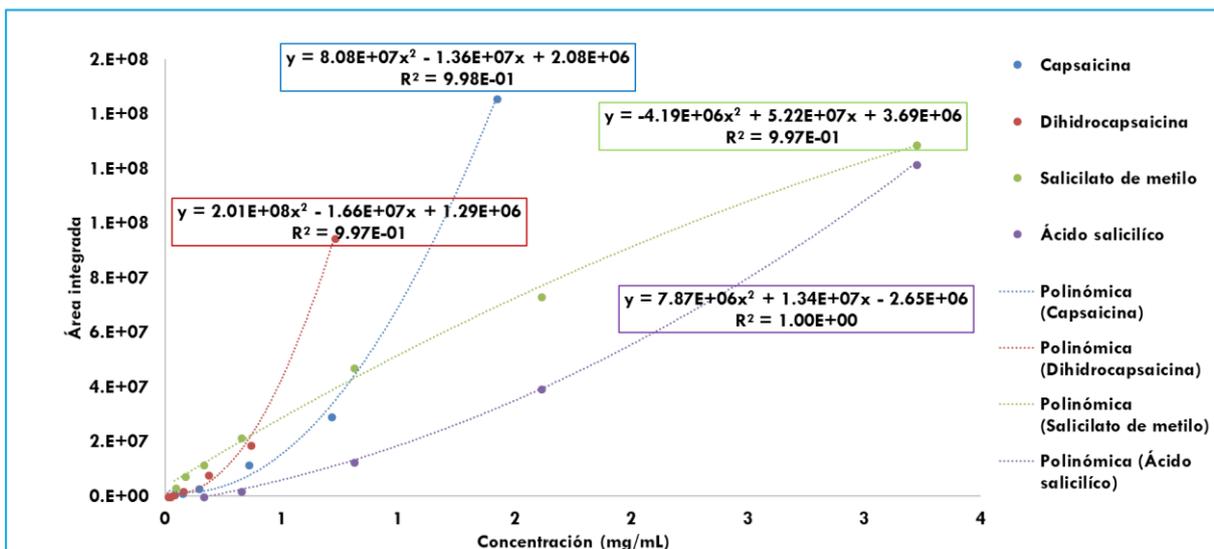


Figura 8. Recta de calibrado de salicilato de metilo, ácido salicílico, capsaicina y dihidrocapsaicina en diclorometano. El mejor ajuste en todas las curvas es con la regresión cuadrática.

Se realizó una regresión sobre las áreas y alturas de integración obtenidas frente a las concentraciones patrón analizadas de los distintos productos terapéuticos. Se avistó que las correlaciones de concentraciones frente a altura no eran tan buenas como las del área, con lo cual se descartaron los datos de altura. Se encontró una correlación cuadrática entre la concentración y el área del pico integrada con coeficientes mayores de 0,99, las demás correlaciones eran peores.

Estas ecuaciones cuadráticas obtenidas fueron utilizadas para sacar la concentración de los distintos productos en el test de estabilidad tanto de fibras como de disolución.

2- Preparación de las muestras y estabilidad en fibras y disolución.

La metodología de este ensayo se explica con la figura 9.

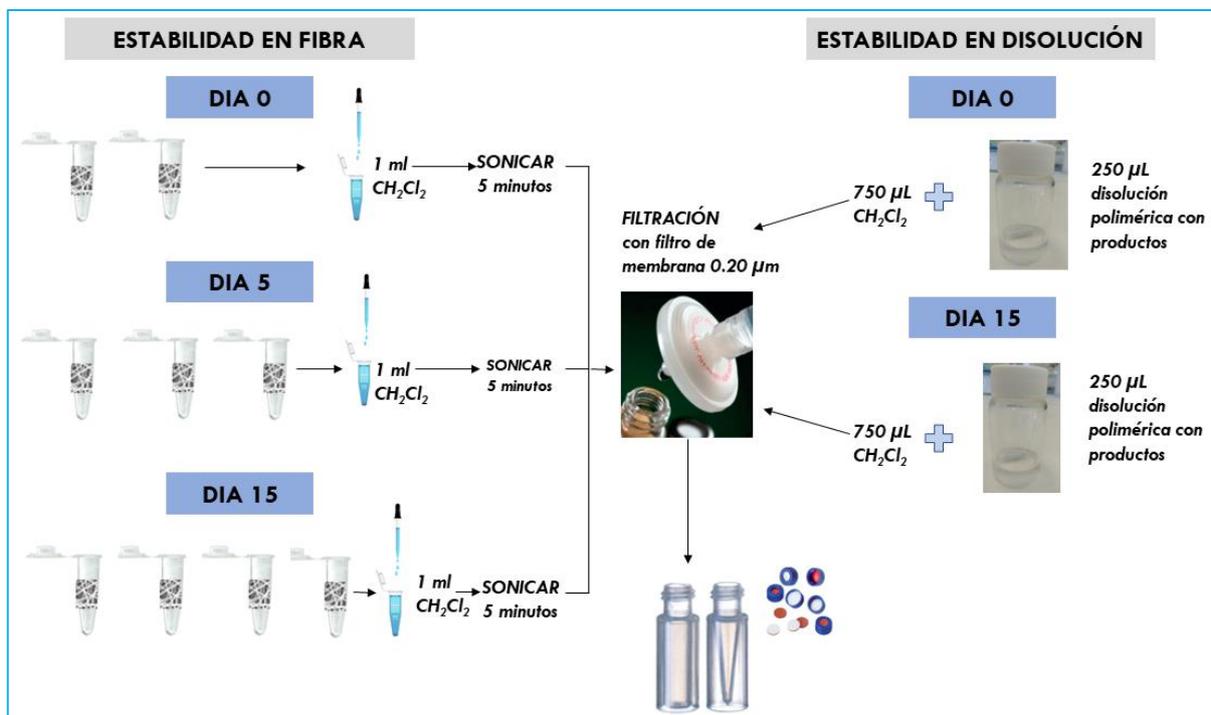


Figura 9. Metodología empleada para la preparación de las muestras de estabilidad en CG-MS en 15 días. Las muestras de fibras y disolución fueron preparadas todas a día 0, y se realizó la estabilidad a los 0, 5 y 15 días. Todas las muestras se diluyen y se filtran a través de un filtro de teflón 0,20 µm.

El tratamiento de los datos fue realizado en Microsoft Excel referenciando la cantidad teórica a la experimental y esto referido al 100, y el error experimental oscila entre 1 y 10%.

3.2.3. Ensayos *in vitro* celulares

3.2.3.1. Cultivos celulares

En los ensayos *in vitro* se ha empleado la línea celular HEK293-VR1(RT) procedente d células humanas embrionarias de riñón y con el canal TRPV1 transfectado de forma estable. Esta línea celular fue

proporcionada por el Prof. Antonio Ferrer. Para el correcto desarrollo y mantenimiento de las células HEK293-VR1(RT) se utiliza el medio celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% de solución de antibióticos penicilina-estreptomina y 0.45 mg/ml de Geneticina 418. Cuando la confluencia en el frasco superaba el 90% las células eran tratadas con una solución al 0.05% de tripsina-EDTA y se les daba un nuevo pase y/o se empleaban para la preparación de las placas de ensayo (96 pocillos). Las células se cultivaron en frascos de 25 cm² a 37°C y 5% CO₂ humidificado y las placas fueron preparadas siendo previamente tratadas con 0,01% poli-L-lisina para permitir la adhesión celular y a una concentración de 40.000 células/pocillo. Posteriormente, se incuban en placa opaca a la luz durante 72 horas previas al experimento. El cultivo y la preparación de las placas para este ensayo fue llevado a cabo por Irene Mudarra Fraguas.

En la determinación de la actividad del canal TRPV1 se ha utilizado una sonda de fluorescencia de calcio debido a que este tipo de canales permiten el paso no selectivo de cationes como el calcio (Ca²⁺). Esta propiedad será la responsable de la medición de dicho ion mediante la sonda Fluo-4 NW (*No wash*, Molecular Probes - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)), la cual la rotura de un enlace en el interior celular hace que aparezca fluorescencia verde y sea activa. Tiene una longitud de onda de excitación en el visible (494 nm) y de emisión (516 nm), es estable en solución a pH 7-7,5 durante horas y además contiene dentro del kit un detergente de baja toxicidad (Probenecid), que hace más permeables las células a la sonda, además de ser un inhibidor de transportadores de aniones orgánicos, evitando las pérdidas de fluorescencia por la salida de la sonda al exterior celular. En este caso, se están probando agonistas, y una activación de este canal provoca un incremento en la concentración de calcio intracelular que es medido por la sonda en forma de un aumento de fluorescencia.

La preparación de las concentraciones de los distintos pocillos fue realizada con DMSO anhidro ((CH₃)₂SO), pureza ≥99,9%. Adquirido en Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos).

3.2.3.2. Ensayos de actividad del canal TRPV1

Se han realizado ensayos celulares para validar la actividad del canal TRPV1. En principio, a excepción del ácido salicílico, se conoce que tanto el salicilato de metilo como la capsaicina [21] son agonistas de dicho canal y que, por lo tanto, la sonda debe de producir fluorescencia en dichos pocillos.

Siguiendo toda la preparación comentada en el apartado anterior, una vez pasadas las 72 horas, se retira el medio celular y se añaden 100 µL de sonda en cada pocillo en oscuridad. La placa opaca a la luz se incuba durante 1 hora, 30 minutos a 37°C para la introducción de la sonda en las células y 30 minutos a 30°C para acondicionar a las células. Una vez finalizado dicho periodo, se toman las medidas de fluorescencia con el espectrofotómetro lector de placas POLARstar Omega (BMG LABTECH GmbH) durante 20 ciclos y a una temperatura interna constante de 30°C. Tras tres ciclos, se añaden manualmente los compuestos, además del control negativo, Rojo Rutenio (RR) a 10 µM, inhibidor no

competitivo [69]. En todos los casos se añade 1 μL en cada pocillo. Una vez en el ciclo 10 se inyecta 1 μL de capsaicina, agonista, a 10 μM en los pocillos seleccionados, y finalizado esto, se continúan las medidas hasta el ciclo 20.

Posteriormente los datos fueron analizados por el software Microsoft Excel observando la activación o inhibición del canal TRPV1 y se calculó el valor Z [70] para determinar la fiabilidad y validar los resultados.

En una placa de ensayo de 96 pocillos, se realiza cada muestra por triplicado dentro de la misma placa. Se realizaron controles negativos con Rojo Rutenio 10 μM y controles positivos con capsaicina 10 μM , ambas concentraciones en pocillo. Las concentraciones de capsaicina se eligieron basándose en la concentración máxima de la capsaicina que produce el 100% de los canales abiertos publicada en bibliografía [71] y a la metodología empleada por la Dra. Asia Fernández Carvajal [72] en sus ensayos de búsqueda de analgésicos mediante cribado de fármacos.

Se tomó de referencia la concentración control de capsaicina de 10 μM en pocillo (1 mM stock) y se extrapoló a las concentraciones en fibra, manteniendo dicha concentración en la capsaicina, y siendo la de los demás agentes 33 μM de salicilato de metilo y 54 μM de ácido salicílico, ambas en pocillo. Las muestras utilizadas fueron 10 mg de nanofibras ya electrohiladas de disoluciones de polímero, de polímero más capsaicina, una antigua y otra reciente, de polímero más ácido salicílico, de polímero más salicilato de metilo, y dos disoluciones poliméricas con los tres productos, siendo una de ellas más antigua que la otra.

Se han realizado controles de todos los agentes terapéuticos unidos a la concentración anterior y un control de la capsaicina y el salicilato de metilo a las concentraciones predichas en los cuales la fibra polimérica se adicionó de forma exógena, no estaban encapsulados estos agentes. Adicionalmente, se realizó una calibración de salicilato de metilo y otra de capsaicina a distintas concentraciones en pocillo.

3.2.4. Desarrollo y estudio *in vivo* de un apósito nanofibroso

El objetivo de este trabajo consistía en la preparación de un apósito de nanofibras con la inclusión de los tres agentes terapéuticos en él. El estudio *in vivo* se ha realizado con tres sujetos sanos totalmente voluntarios, totalmente conocedores del experimento a realizar y en los cuales se han probado tanto el apósito control conteniendo exclusivamente el polímero como el apósito modelo desarrollado en este Trabajo Fin de Grado. En ambos apósitos la concentración polimérica ha sido del 25%, y la concentración de capsaicina y salicilato de metilo ha sido del 1% (p/p) y del 1,5% en ácido salicílico (p/p).

El apósito nanofibroso ha sido desarrollado a partir de unos *films* de poliuretano transparentes hipoalérgicos 10x12 cm (Skin-film, Bimedica, Molins de Rei, Barcelona, España) en el cual han sido depositadas las fibras mediante la electrohilatura en una superficie de 5 x 5 cm del apósito total. La carga de fibras fue realizada en un periodo de 30 minutos en la electrohilatura. Una vez realizada la

carga de fibras en dicha superficie, se adhirió a la piel. Debido a la toxicidad de la capsaicina ante un estímulo como es la luz solar, se decidió no poner los apósitos en lugares donde pudiera dar el sol durante el experimento para evitar posibles efectos a larga duración.

Los apósitos fueron colocados a los seres en los bíceps de los brazos o en los cuádriceps de las piernas. Los sujetos no supieron qué tipo de apósito era colocado en cada pierna/brazo para evitar engaños. El experimento en total duró 8 horas, en las cuales se observó la evolución de los apósitos de fibras en los 3 sujetos a los 30, 60, 120, 240 y 480 minutos, teniendo todo documentado mediante material fotográfico. Los síntomas o efectos adversos ocurridos durante el experimento han sido de igual manera documentados por los individuos. Los individuos eran conscientes y se les había explicado qué se les estaba probando y qué si no lo soportaban podían dejar el tratamiento antes de clausurar el ensayo clínico cuando ellos quisieran.

Para evitar problemas durante esta presentación del Trabajo Fin de Grado, se ha realizado un papel en el cuál ellos confirman su inclusión dentro del ensayo y que ellos son voluntarios, firmándolo.

4. Resultados

4.1. Optimización de las nanofibras poliméricas mediante parámetros operacionales

4.1.1. Sin agentes terapéuticos

Para la optimización de fibras sin contenido, además de las diferentes concentraciones de PMVEMA-ES (20-28%), también se optimizaron los siguientes parámetros: voltaje (6-17,5 kV), distancia aguja-colector (8-30 cm), flujo de bombeo (0,25-1,35 mL/h) y calibre de la aguja (18 (50,8 mm de longitud, diámetro externo 1,270 mm y diámetro interno 0,838 mm) y 20 (101,6 mm de longitud, diámetro externo 0,902 mm y diámetro interno 0,584 mm)).

Una vez analizados los resultados, se ha decidido referenciar todos los tamaños a la aguja de calibre 20, ya que se obtenían resultados de diámetros de fibra menores.

Respecto a la concentración, en la Figura 10, se observa una escala desde el 20% hasta 28% de polímero p/p en etanol. El resultado obtenido a partir de la disolución PMVEMA-ES 20% p/p fueron nanofibras con imperfecciones y aspecto de “perlas en cadena” (Figura 10A). Si se incrementa la concentración, a 22,5% p/p de PMVEMA-ES (Figura 10B) se origina heterogeneidad en la muestra con distintos grosores y orientadas al azar. En la Figura 10D, se observa un 28% p/p de PMVEMA-ES, el cual origina fibras más gruesas y con zonas en las que el etanol no se evapora bien (zona más blanquecina y brillante). Finalmente, a una concentración intermedia, 25% p/p de PMVEMA-ES (Figura 10C), se demuestran resultados óptimos, con fibras más o menos heterogéneas, sin imperfecciones y con

un rango dentro de la escala nanométrica. Esta concentración será la seleccionada para los próximos estudios.

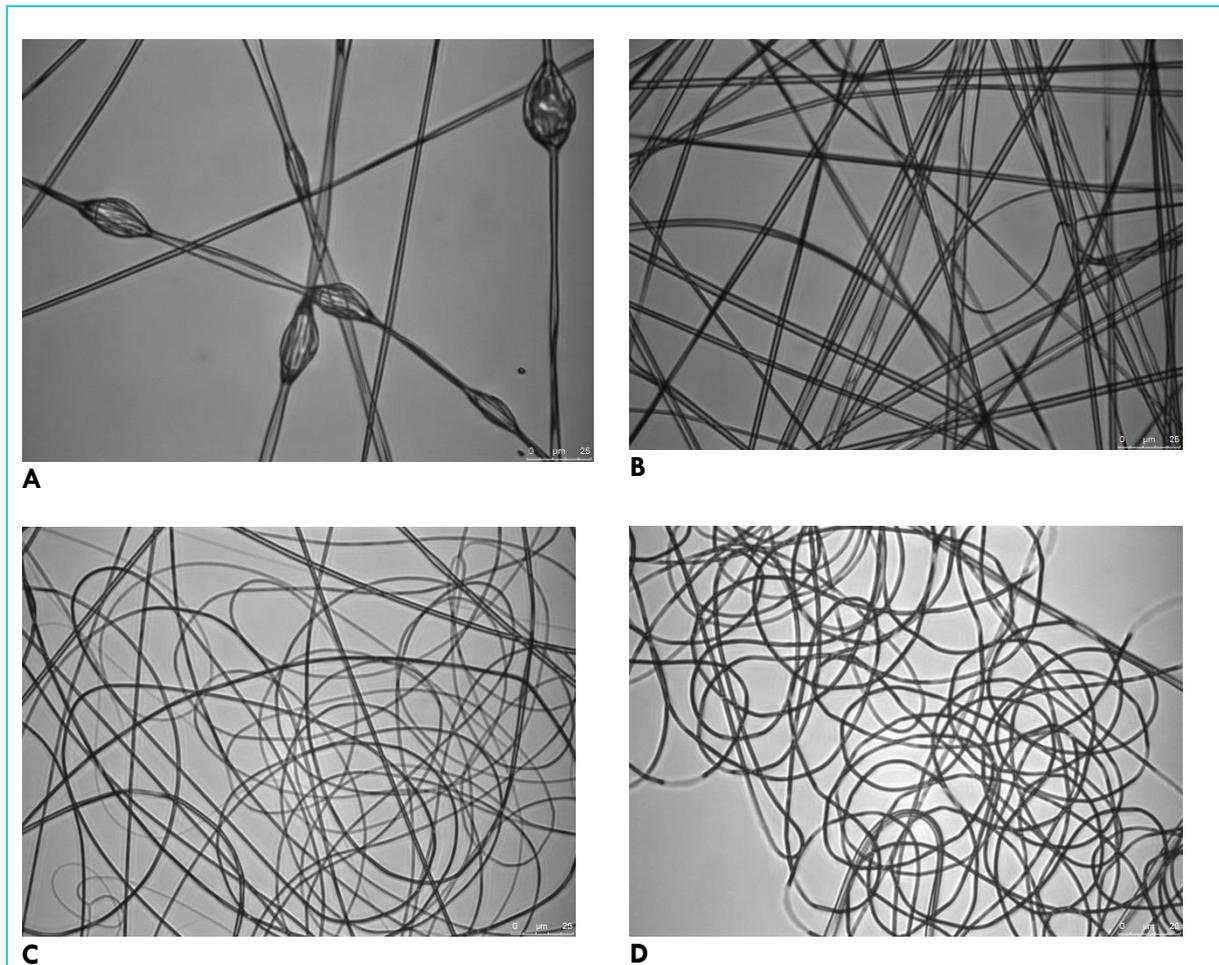


Figura 10. Nanofibras de PMVEMA-ES a partir de disoluciones con distintas concentraciones. **A.** 20% p/p. **B.** 22,5% p/p. **C.** 25% p/p. **D.** 28% p/p.

En los resultados del flujo, se han probado flujos desde 0,25 hasta 1,35 mL/h, manteniendo fijo el voltaje y la distancia. Podemos decir que el voltaje influye en él de forma indirecta (Figura 11A). Se ha demostrado que manteniendo fija la distancia de 18 cm, y teniendo para los mismos voltajes los mismos parámetros de flujos, sigue una correlación, siendo el flujo óptimo de 17,5 kV, 0,75 mL/h, de 15,5 kV 1 mL/h y de 12,5 kV 1,25 mL/h, todos estos datos a una distancia de 18 cm. En cuanto a la Figura 11B, podemos decir que la distancia es proporcional al flujo, a mayor distancia, mayor flujo.

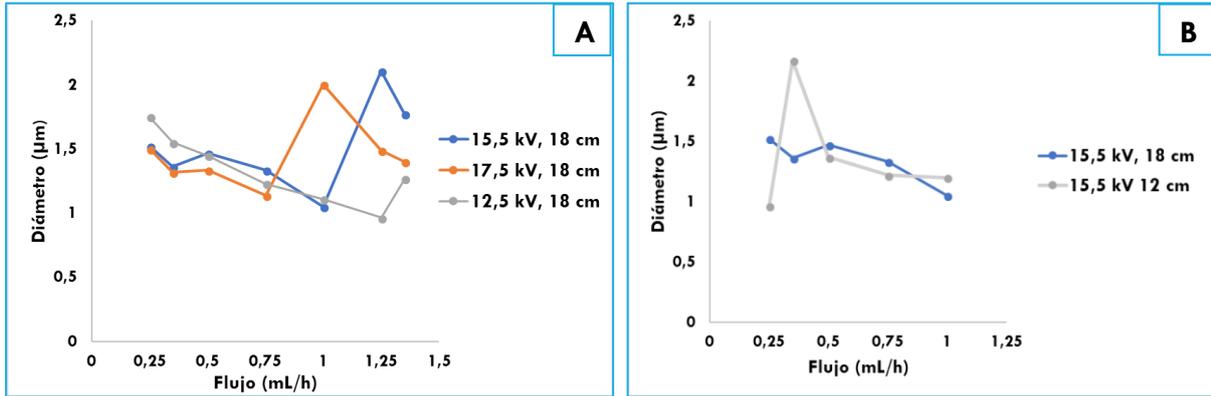


Figura 11. A. Variación del flujo (0,25-1,35 mL/h) óptimo a distintos voltajes (12,5-17,5 kV), manteniendo fija la distancia (18 cm). **B.** Variación del flujo (0,25-1 mL/h) óptimo a distintas distancias (12 y 18 cm), manteniendo fijo el voltaje (15,5 kV).

Respecto al voltaje, sucede lo mismo con el flujo, hecho anteriormente ya comentado. Se han probado voltajes de 6,5 a 15,5 kV y distancias desde 6 hasta 30 cm. Con la distancia se ve predominantemente que, a distancias más bajas, las fibras disminuyen más el tamaño. Se puede definir que a 8 cm hay un rango de fibras óptimo a probar entre 6,5-9,5 kV. A partir de 9,5 kV hasta 15,5 kV (probado experimentalmente), la distancia óptima es 12 cm.

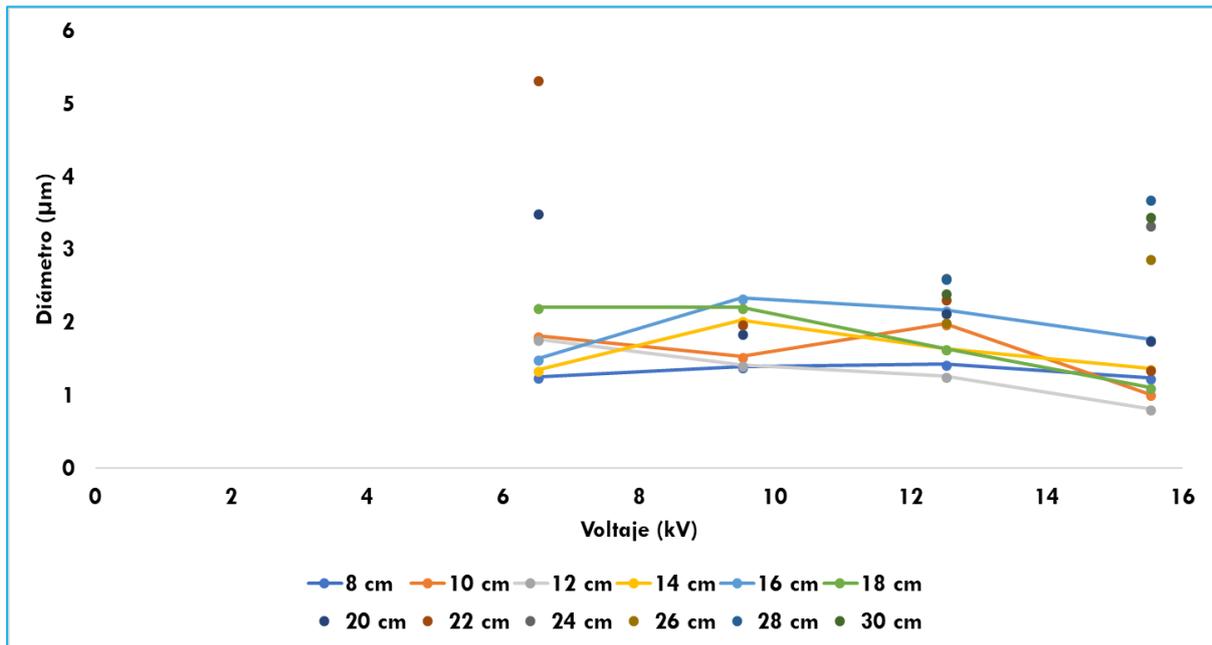


Figura 12. Variación del voltaje (6,5-15,5 kV) respecto a la distancia (8-30 cm). A distancias más bajas, los diámetros son menores.

Lo dicho y comentado de la relación flujo-distancia y voltaje-distancia se sostiene para los experimentos de distancia.

Con lo cual, la mejor combinación para dar el mejor resultado de nanofibras poliméricas es 15,5 kV, 12 cm, (Figura 12) y 0,25 mL/h (Figura 11B), según los datos de optimización recabados, con un tamaño de 810 nm de media (Figura 13, a continuación).

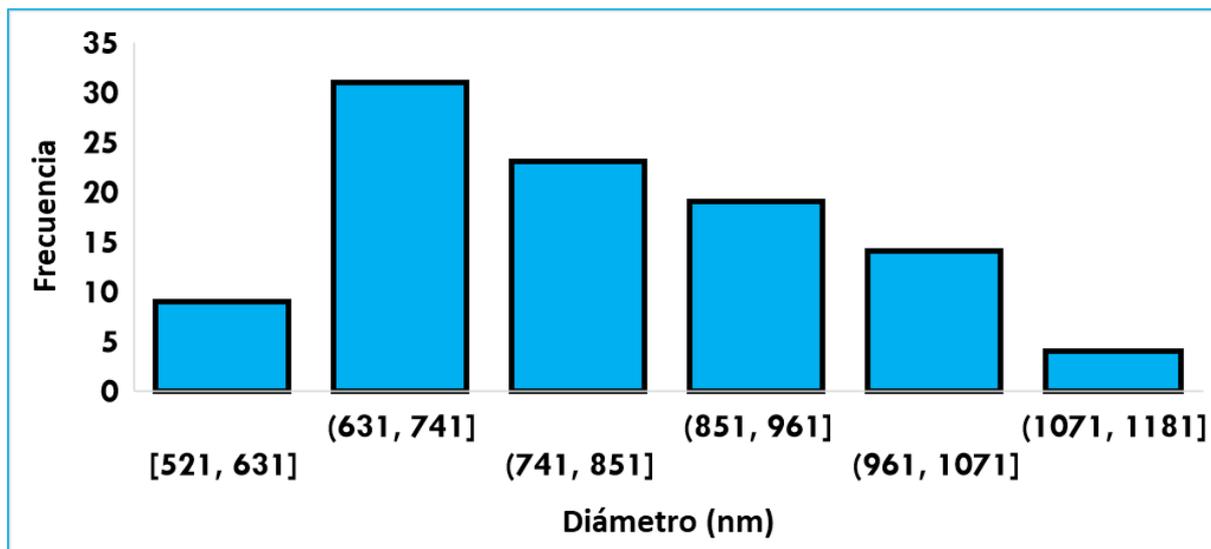


Figura 13. Histograma de los diámetros obtenidos en las fibras de PMVEMA-ES 25%p/p, 15,5 kV, 12 cm y 0,25 mL/h con un diámetro medio de 810 ± 141 nm.

4.1.2. Con agentes terapéuticos

Para la optimización de fibras con contenido se siguieron parámetros parecidos a los anteriores, probando concentraciones de 24-25% de polímero, voltaje (14,5-19 kV), distancia aguja-colector (6-10 cm), flujo de bombeo (0,25-0,5 mL/h) y los dos calibres de agujas.

Una vez analizados los resultados, se ha decidido referenciar todos los tamaños a la aguja de calibre 20, ya que se obtenían resultados de diámetros de fibra menores.

El dato anterior de optimización del polímero PMVEMA al 25% p/p se analizó para este caso de polímero más los tres agentes terapéuticos y el resultado varió aumentando en casi 200 nm. Con lo cual, se volvió a optimizar el método para intentar tener las fibras por debajo de la micra. Se decidió no variar el flujo, pero sí el voltaje y la distancia por encima y por debajo de la anterior propuesta. Con todo esto ejecutado, se observó que la mejor distancia era 8 cm, con lo cual se llevó a cabo un barrido de voltaje desde 13,5 hasta 17,5 kV. Según los datos obtenidos en la Figura 14, vemos que según la cantidad de voltaje varía bastante el diámetro. El mejor resultado se aprecia a los 17 kV de voltaje, con lo cual este resultado junto con el de 0,25 ml/h de anteriormente y 8 cm, sería el resultado final de la optimización.

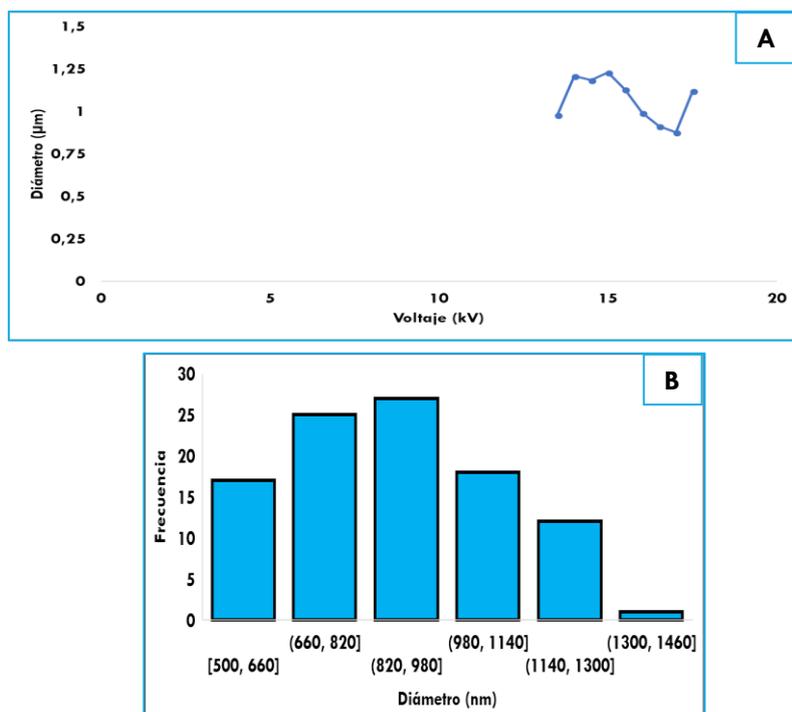


Figura 14. A. Variación del diámetro de las fibras al variar el voltaje (kV), manteniendo fija la distancia (8 cm) y el flujo (0,25 mL/h). **B.** Representación en forma de histograma de los rangos obtenidos en PMVEMA-ES 25%p/p encapsulado con un diámetro medio de 878 ± 209 nm.

Adicionalmente, se midieron las fibras realizadas con la aguja de calibre 18 y 20 y se comprobó que la aguja de calibre 20 es mejor para la consecución de nanofibras, siendo estas más pequeñas, aproximadamente 50 nm, como se muestra a continuación en una comparación.

4.2. Estudio de la microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se han realizado imágenes de las fibras elaboradas con el microscopio electrónico de barrido del control, PMVEMA-ES y con el polímero anterior más los tres productos deseados introducidos. Se obtuvieron imágenes representativas de ambos como se muestra en la Figura 17. Todas las mallas fabricadas mostraron fibras orientadas al azar, y con medidas similares a las realizadas con el microscopio óptico (Figura 13 y 14B), siendo el electrónico más preciso en las medidas y con desviaciones estándares menores. En consecuencia, se han decidido validar las medidas realizadas durante toda la optimización del microscopio óptico. En cuanto a la morfología, se ven fibras uniformes y sin defectos, en ambos casos.

Las medidas obtenidas en el microscopio electrónico son 808 ± 31 nm (Figura 17A) en el caso de PMVEMA-ES y 875 ± 49 nm (Figura 17B) en PMVEMA-ES con contenido terapéutico.

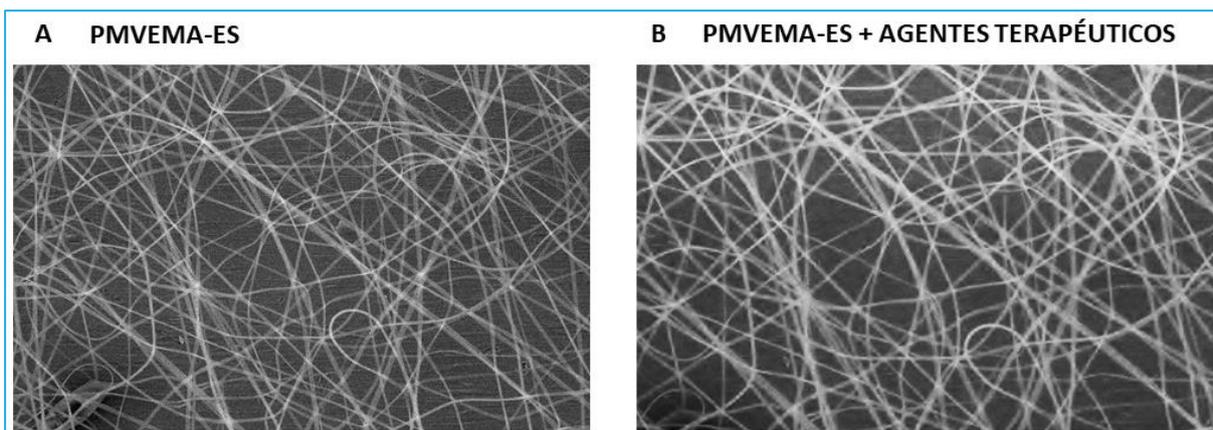


Figura 17. Microscopia electrónica de barrido (SEM). Imágenes representativas de **A.** PMVEMA-ES 25% p/p en etanol. Parámetros operacionales utilizados: 15,5 kV, 12 cm y 0,25 mL/h. **B.** PMVEMA-ES 25% p/p en etanol más capsaicina al 1%, ácido salicílico 1,5% y salicilato de metilo al 1% (p/p). Parámetros operacionales: 17 kV, 8 cm y 0,25 mL/h.

4.3. Estudio de estabilidad en el tiempo en la fibra y disolución polimérica por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.

Se han detectado los tiempos de retención de una manera precisa y concisa, previamente en el calibrado y posteriormente en la inyección de muestras.

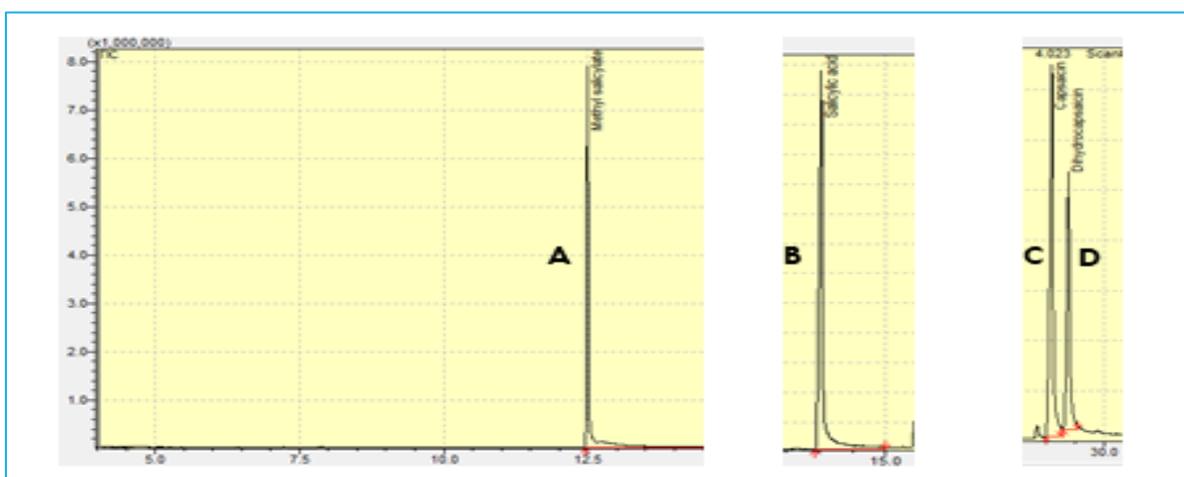


Figura 18. Cromatograma de los picos y tiempos de retención obtenidos de los agentes terapéuticos. **A.** Salicilato de metilo (12,5 min). **B.** Ácido salicílico (14,0 minutos). **C.** Capsaicina (29,0 minutos). **D.** Dihidrocapsaicina (29,3 min).

Para corroborar la alta pureza del salicilato de metilo, esta es observada en la figura 19A a una dilución 1:4 del patrón de salicilato de metilo. No se observa ningún pico excepto el pico a 12,5 minutos correspondiente a salicilato de metilo, con lo que se puede deducir que como mínimo la pureza es mayor o igual al 99%, pureza del reactivo de partida.

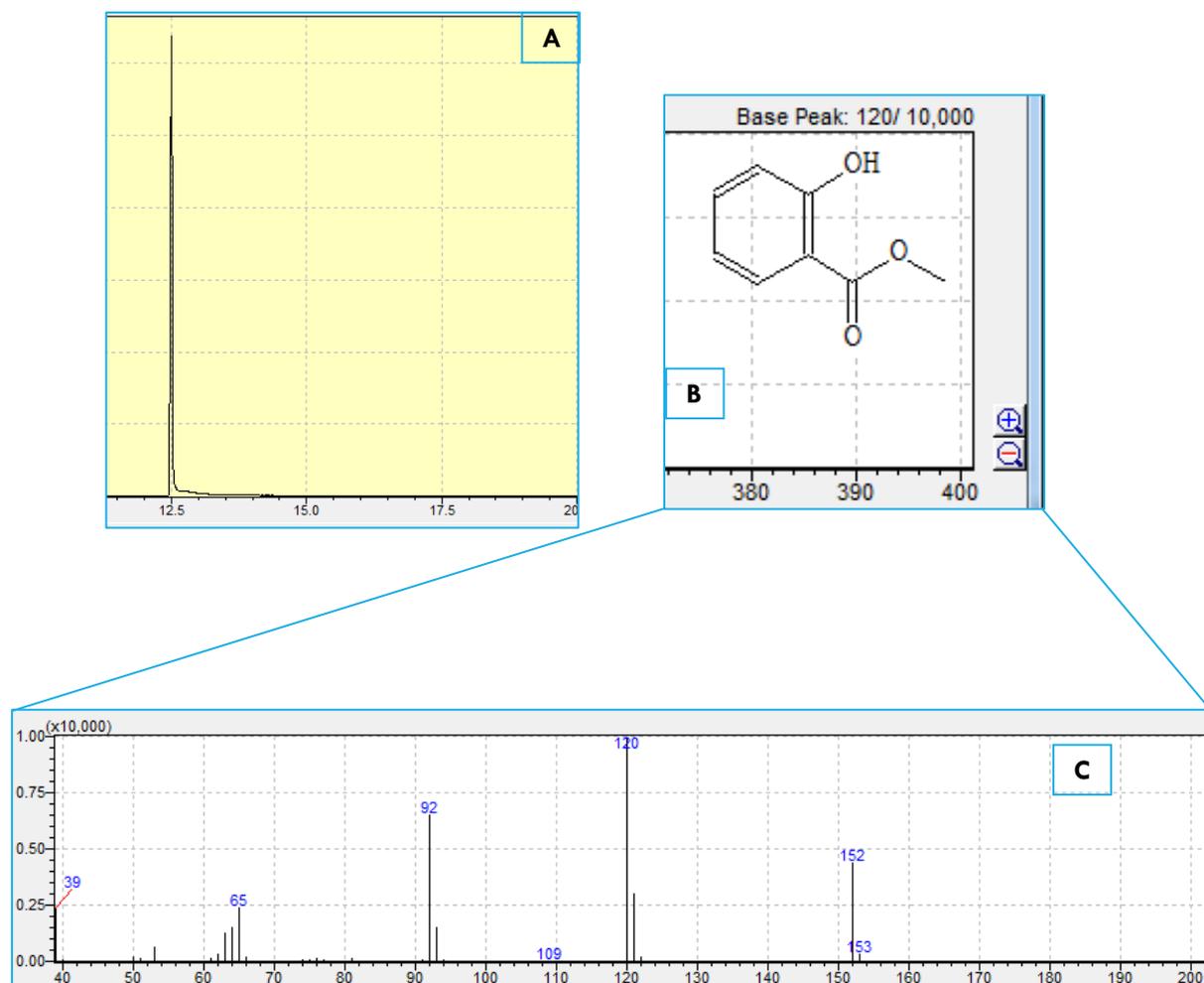
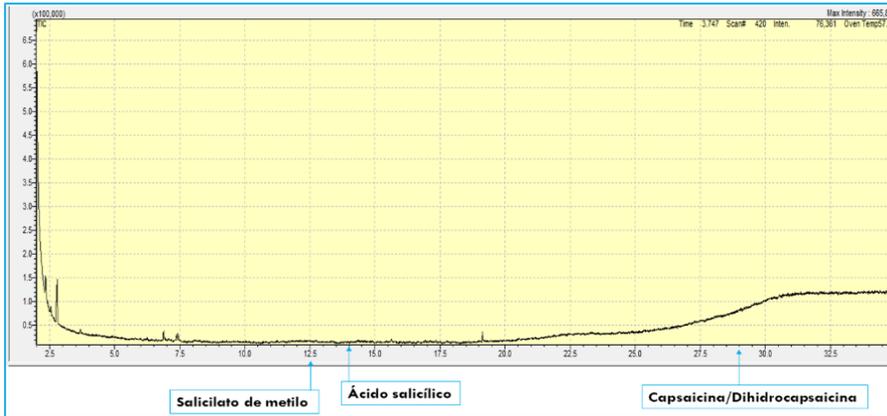


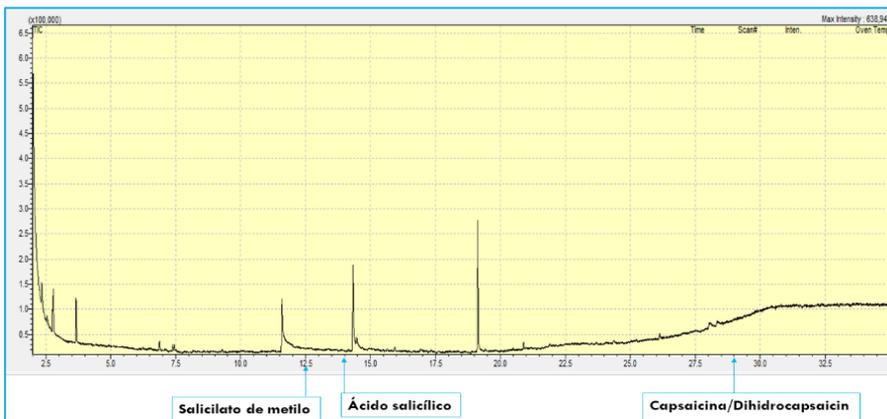
Figura 19. Detalle del cromatograma de gases (A), fórmula química (B) y un espectro de masas (C) confirmada con la base de datos bibliométricos.

4.3.1. Resultados del ensayo de estabilidad

Según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. (Figura 9) se realizaron diluciones de la muestra a 1:10 y 1:100 para tener triplicados de concentraciones distintas para cada uno de los componentes durante 15 días. Esto se descartó una vez vistos los resultados del día 0, ya que ni en 1:100 ni un 1:10 se detectaba ninguno de los componentes, como veremos a continuación, Figura 20.



A
1:100



B
1:10

Figura 20. Cromatogramas de gases con dos disoluciones recién preparadas (A y B).

En el test de estabilidad, los resultados indican que el salicilato de metilo se pierde con el paso del tiempo tanto en fibra como en disolución, pero en esta última la pérdida es mucho menor. Los demás productos se mantienen de manera uniforme, aunque al igual que el salicilato de metilo, en disolución se conservan mucho mejor, perdiendo menos su concentración. Observamos que el metil salicilato en disolución pierde un 15% a los 15 días mientras que en fibras pierde casi un 50%. Por el contrario, el ácido salicílico pierde 0,4% en disolución y 6% en fibras a los 15 días. Los valores de capsaicina y dihidrocapsaicina son menores, 0,002 y 0,1% en disolución mientras que en fibra 8 y 5%, respectivamente.

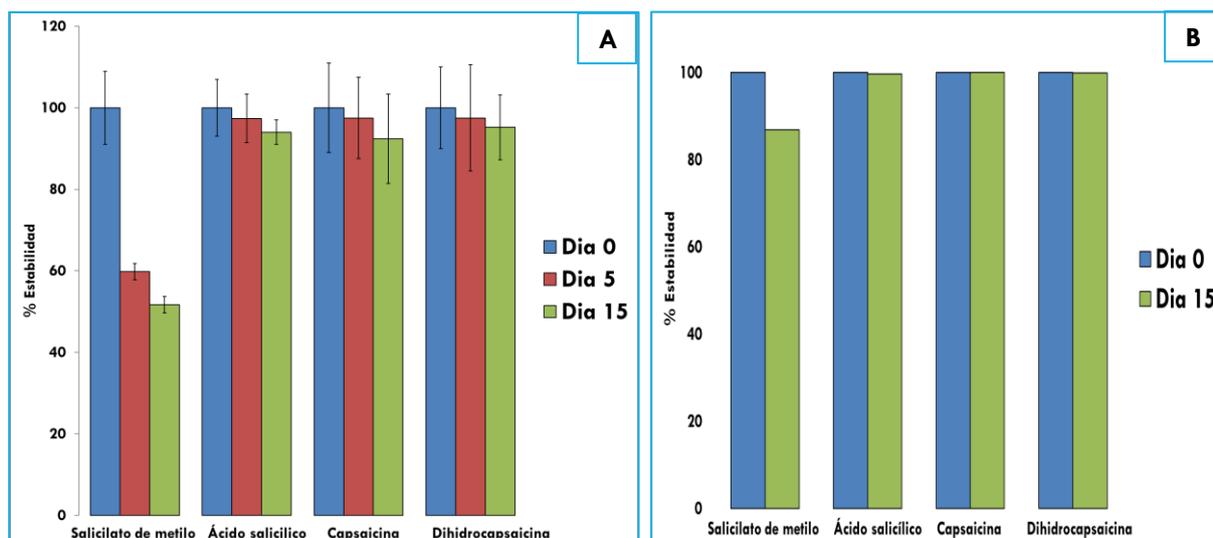


Figura 21. Resultados del test de estabilidad en fibra (A) y en disolución (B) durante 15 días. En la disolución preparada para este ensayo iban concretamente 0,990% de salicilato de metilo, 1,599% de ácido salicílico, 0,617% de capsaicina y 0,315% de dihidrocapsaicina (p/p) respecto al polímero. Cada valor representa la media \pm la desviación estándar (n=2) a los 0 y 5 días y a los 15 días (n=4) en el ensayo de estabilidad en fibra.

El método usado en el cromatógrafo permitía ver restos de etanol en las fibras al comienzo del cromatograma, con lo cual, este hecho se confirmó y miró en detalle para todos los cromatogramas con fibras. En las muestras en forma de nanofibras no se observó ningún pico de etanol, mientras que sí en las del disolución (control positivo de etanol), concretamente de 2 a 2,321 minutos. Esto es coherente con el hecho de que el etanol en las fibras ha sido eliminado en el proceso de electrohilatura.

4.4. Ensayos *in vitro* con la línea celular HEK293-VR1 (RT)

Los ensayos recogidos son bastantes similares, con lo cual hay buena representatividad de los datos. Se ha realizado el valor Z en ambos casos y da un valor de 0,85 y 0,90. Los resultados obtenidos en el ensayo de actividad demuestran que tanto la capsaicina como el salicilato de metilo tienen actividad frente a este canal, siendo la capsaicina la responsable de su mayor actividad. El ácido salicílico no está constatada la información de que active el canal, habría que realizar nuevos experimentos, aunque es probable debido a su pH ácido [73].

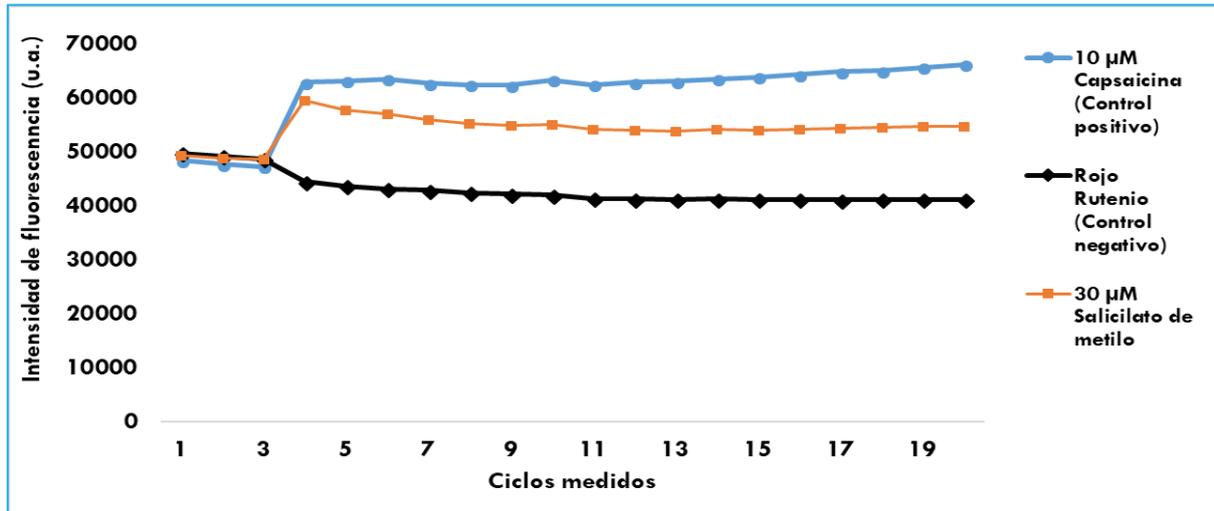


Figura 22. Intensidad de fluorescencia medida de capsaicina, salicilato de metilo y rojo rutenio, antagonista del canal, durante 20 ciclos.

La calibración de capsaicina ha delatado que se cumple la proporción de a mayor aumento de concentración, mayor intensidad de fluorescencia, al menos desde 0,1 μM hasta 30 μM, sin haber ningún efecto inhibitorio. Y en salicilato de metilo ocurre de forma parecida, aunque una vez que llega a 60 μM se estanca la intensidad de fluorescencia, sin variar en exceso.

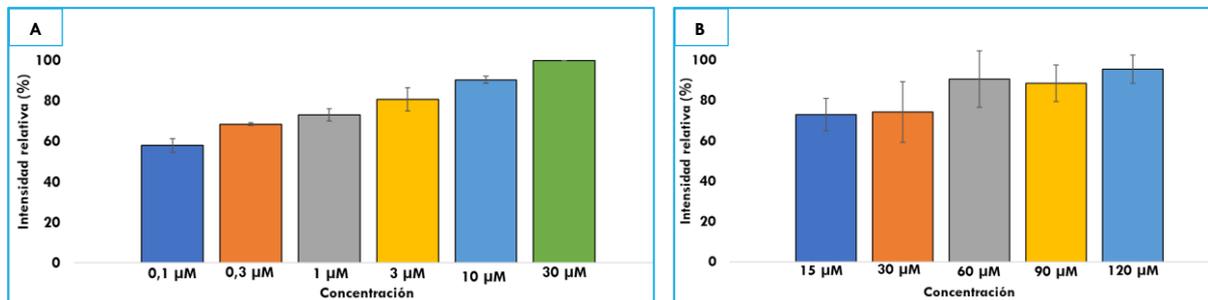
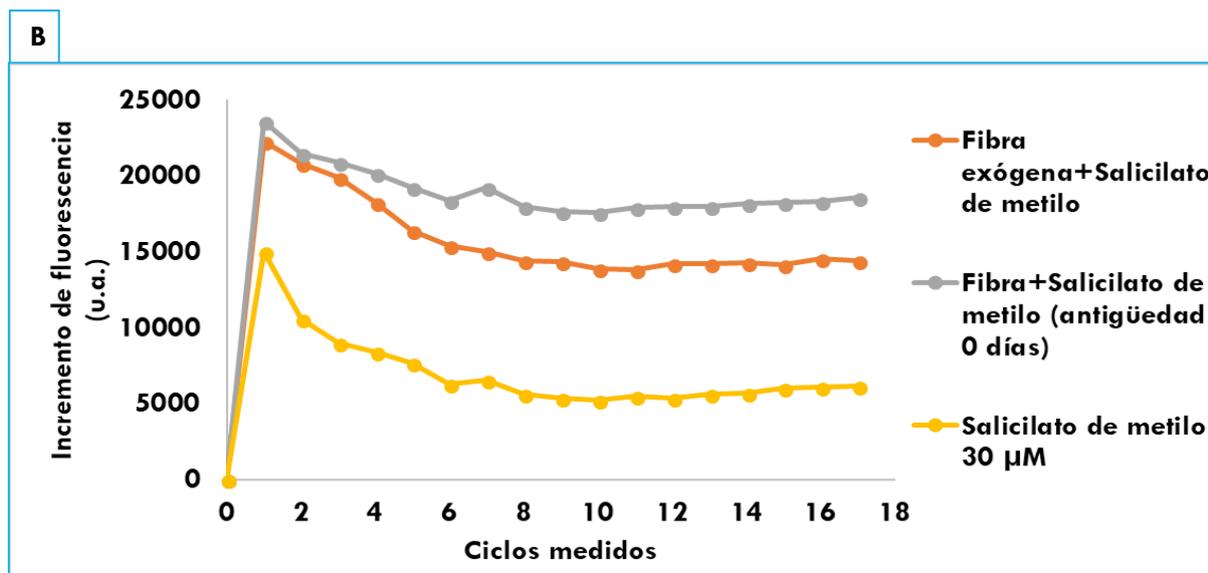
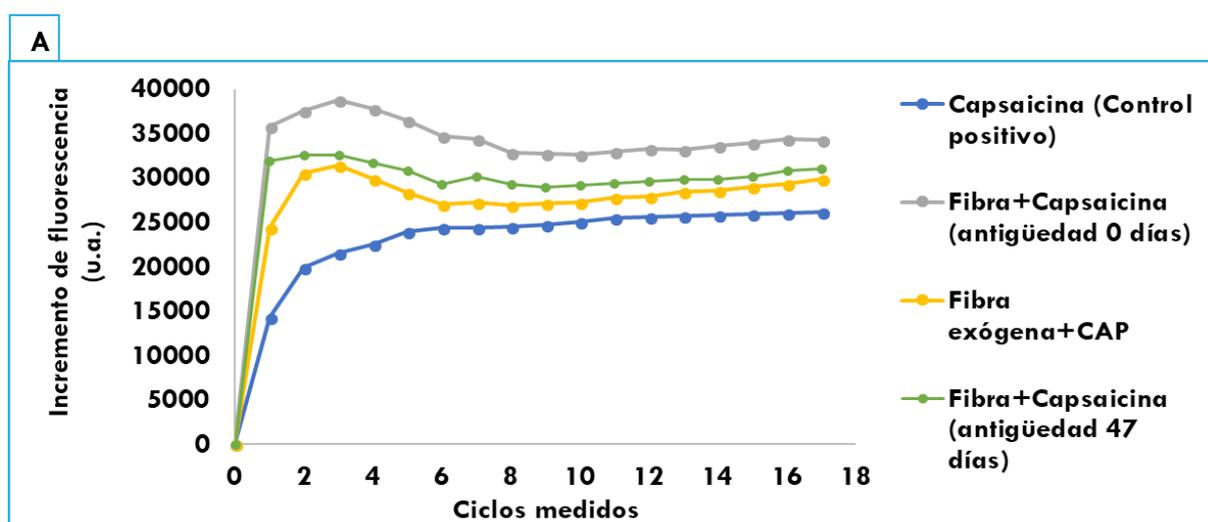


Figura 23. Calibrados de capsaicina (A) y salicilato de metilo (B) a distintas concentraciones. Cada valor representa la media \pm la desviación estándar ($n=3$).

Adicionalmente, se han observado los efectos que tiene el propio agente encapsulado y la fibra añadida de forma exógena con el producto (aparentemente sin encapsular), además de los controles. Se visualiza que en la figura 24A, la fibra estabiliza la capsaicina cuando está encapsulada dando mayor actividad. Indiscutiblemente, cuando la disolución es más reciente, la actividad es mayor, debido a que las propiedades fisicoquímicas no han sido modificadas. Han sido calculados los porcentajes de activación más relevantes y en este caso, es relevante comentar que hay un 15% de activación entre cuando la fibra se añade de forma exógena a cuando la fibra tiene encapsulado contenido, esto respecto a la disolución más reciente. La diferencia entre la disolución más reciente (a los 0 días) y la más antigua (a los 47 días) ha sido un 10% de activación favorable a la disolución realizada el mismo día.

En la figura 24B, ocurre lo mismo, la fibra estabiliza el contenido encapsulado. La activación de las fibras exógenas con contenido frente a las fibras encapsuladas, estas últimas aumentan un 21% respecto a las otras.

Y, por último, en la figura 24C, ocurre lo mismo que en la figura 24A, siendo las disoluciones más recientes más activas y la fibra encapsulada dando mayor actividad que si está añadida exógenamente. Respecto a la activación mayor dada por la fibra encapsulada (disolución realizada a los 20 días), se puede decir que aumenta un 44% respecto a la fibra con los 3 productos añadidos de forma exógena. La activación de la disolución reciente (a los 0 días) y la disolución antigua (a los 20 días) aumenta aproximadamente un 9% a favor de la disolución más reciente.



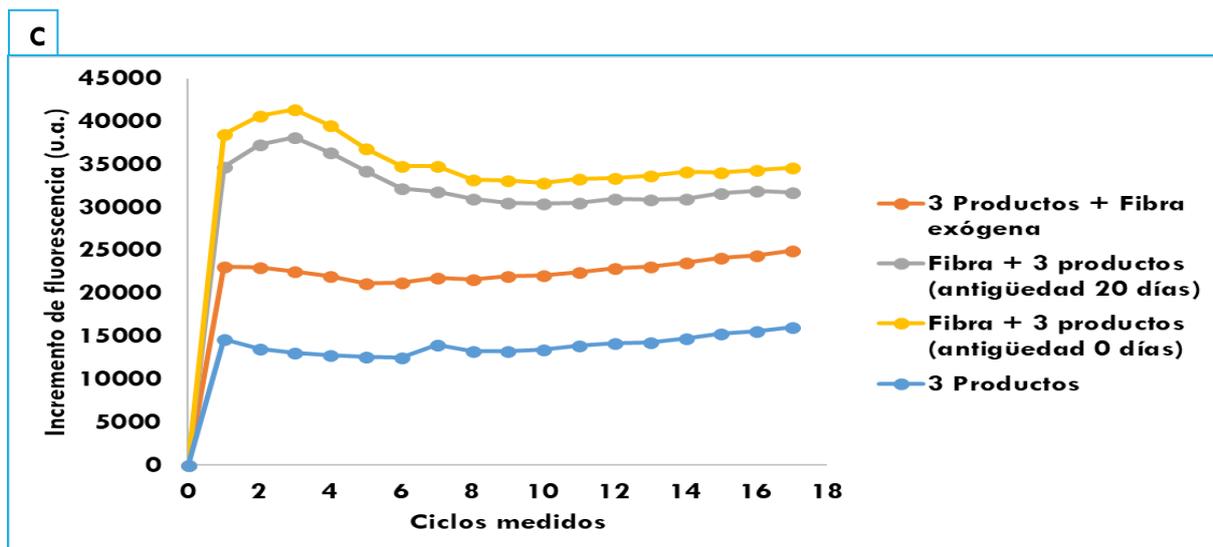


Figura 24. A. Incremento de fluorescencia obtenida en capsaicina encapsulada (disolución realizada a los 0 y 47 días), no encapsulada en fibra y como control. B. Incremento de fluorescencia obtenida en salicilato de metilo encapsulado, no encapsulada en fibra y como control. C. Incremento de fluorescencia obtenida con los tres productos encapsulados (disolución realizada a los 0 y 47 días), no encapsulados en fibra y como control.

4.5. Ensayos preliminares en voluntarios del apósito nanofibroso

Sendos individuos comentaron la sensación de calor mezclada con rubor en algún momento durante las 8 horas, con la consiguiente calma de estos síntomas posteriormente. La actuación del canal TRPV1 en dicho apósito actúa correctamente, siendo la capsaicina el componente más influyente en esta respuesta. El individuo 1 entre las 3 y 6 horas tuvo el efecto mayor. El individuo 2 entre las 4 y 8 horas. Por último, el individuo 3 su efecto mayor ocurrió a las dos horas. Hay que comentar que los distintos tiempos de actuación del efecto en el apósito se deben a las temperaturas a las que está dicho cuerpo, es decir, en cuerpos con mayor temperatura corporal y/o expuestos al sol, las fibras eran consumidas con mayor facilidad y, por lo tanto, el efecto se daba mucho antes [74]. Sin embargo, en individuos con menor temperatura corporal y/o habitando en sitios frescos, el efecto se retrasaba.

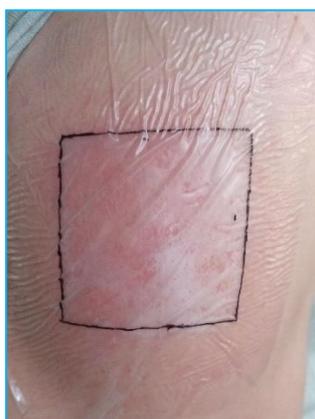


Figura 25. Imagen representativa del efecto *in vivo* del apósito de nanofibras poliméricas con tres agentes terapéuticos ante la activación del canal TRPV1.

Los apósitos utilizados en los distintos individuos se describen a continuación con sus respectivos pesos por cm².

Tabla 2. Peso en microgramos por cm² de apósito utilizado, en este caso, al ser un apósito 5x5 cm, 25 cm².

		Peso Capsaicina (µg)/cm²	Peso Dihidrocapsaicina (µg)/cm²	Peso Salicilato de metilo (µg)/cm²	Peso Ácido salicílico (µg)/cm²
Apósito X	<i>Con polímero más agentes terapéuticos</i>	7,5	3,8	11,8	17,6
Apósito Y	<i>Con polímero más agentes terapéuticos</i>	7,9	4,0	12,4	18,6
Apósito Z	<i>Con polímero más agentes terapéuticos</i>	8,1	4,2	12,7	19,0

5. Discusión

Este trabajo describe la síntesis y optimización de nanofibras electrohiladas con capacidad encapsuladora utilizando un derivado de PMVEMA, en concreto, PMVEMA-ES como fuente polimérica. Hay pocos trabajos que datan de este copolímero del anhídrido maleico y metil vinil éter como polímero encapsulador [57], la mayoría de estos lo utilizan por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad o rigidez a la estructura final [75] [54]. Estos ejemplos incluyen nanofibras electrohiladas sintetizadas a partir de una mezcla de gelatina y PMVEMA a una relación 4:1 con una concentración final de 10 % y cargadas con nanopartículas que contienen óxido de zinc, y que se utilizaron como parte de una película de gelatina diseñada para favorecer la cicatrización de heridas [54]. En el otro estudio, nanofibras cargadas con nanopartículas de plata se produjeron mediante electrohilado a partir de una mezcla de poliestireno-PMVEMA al 50/50 % en peso para recubrir y proporcionar propiedades antimicrobianas a otras membranas experimentales [75].

En la elección del apósito propuesto para la psoriasis, los productos terapéuticos a encapsular dentro del polímero se seleccionaron en base a su efecto terapéutico y a una concentración adecuada para el tratamiento de dolor, picor y descamación de la psoriasis (tratamiento paliativo). Por ejemplo, la capsaicina se ha introducido al 1% respecto al polímero en base a la bibliografía de nanofibras o nanopartículas cargadas con dicho agente para uso tópico en psoriasis [76] [77]. Existe un parche comercial de capsaicina al 8%, *Qutenza Astellas*, que se utiliza para tratar el dolor neuropático. No hay datos descritos de concentración en nanoestructuras para el salicilato de metilo, pero sí que es usado de forma tópica para tratar el dolor en general, especialmente el músculo-esquelético [21]. Además se ha usado comercialmente en combinación con el mentol [78]. Las concentraciones usadas en cremas suelen ser más elevadas con datos del 10% al 30% p/p (*Crema Bengay e Icy Hot*) o incluso 45% en el caso del gel *Reflex*. Debido a los niveles de toxicidad de los salicilatos (150 mg/kg) y al tener el ácido salicílico una estructura similar, se decidió reducir la concentración en fibra del salicilato de metilo al 1% y así, intentar evitar posibles problemas de toxicidad. Además, el diseño inicial ya incluye un potente analgésico como es la capsaicina. Por último, el ácido salicílico se suele usar en concentraciones de 0,5 a 60% p/p para el tratamiento de psoriasis [19], siendo la concentración elegida en este trabajo 1,5% p/p, similar a las concentraciones usadas en cremas de acné [79].

En nuestro estudio, se han optimizado los ajustes generales del electrohilado con el fin de sintetizar nanofibras regulares y de tamaño nano. Se encontraron algunas dificultades con el polímero, entre ellas su concentración. Se observó que ésta es crítica para la formación de nanofibras homogéneas, uniformes y de tamaño adecuado, lo que podría ser debido a cambios en la viscosidad de estas soluciones. De hecho, ya se ha descrito la influencia de la viscosidad de las disoluciones poliméricas sobre la morfología y el tamaño durante el proceso de electrohilado [80], incluso para el polímero PMVEMA-ES [57]. La encapsulación de diferentes compuestos requiere la optimización y ajuste de los parámetros operacionales del proceso de electrohilado. Tras dicha optimización, los parámetros seleccionados variaron ligeramente con respecto a los descritos previamente, de 15 kV a 15,5 kV, de 10 cm a 12 cm y el flujo se mantuvo igual. Para este electrohilado de polímero más los tres agentes terapéuticos también se tuvo que variar ligeramente los parámetros, pero basándose en los anteriores. En concreto, los parámetros fueron 17 kV, 8 cm y 0,25 mL/h, variando el voltaje y la distancia anterior.

Según los parámetros optimizados, los diámetros de las nanofibras poliméricas han sido caracterizados mediante microscopía óptica y electrónica con unos valores aproximados de 810 ± 141 nm y 808 ± 31 nm, respectivamente. La optimización realizada en el caso del polímero con los agentes terapéuticos demostró que el diámetro de las fibras aumentó ligeramente siendo 878 ± 209 nm en microscopía óptica y 875 ± 49 nm en microscopía electrónica. Como se puede observar, la microscopía electrónica a priori resulta mucho más precisa en las medidas y además se ven mucho mejor la morfología de ellas. Esto es debido también a las limitaciones del microscopio óptico como el borde

birrefringente, el cual nos permite hacer medidas que no se corresponden con la realidad. Pero la microscopia electrónica, por otro lado, tiene un coste y mantenimiento mucho más alto.

En cuanto a la estabilidad en fibra de los agentes terapéuticos, se ha comprobado que sus niveles se mantienen estables, a excepción del salicilato de metilo que va perdiendo el compuesto a medida que pasan los días, lo que puede ser debido a su volatilidad y al aumento del área superficial y consecuente mayor capacidad de evaporación [81]. En disolución, el salicilato de metilo es el que más pierde, pero mucho menos que en fibra (15% en disolución frente al 50% en fibra). En los demás compuestos no se observan diferencias.

En los ensayos celulares *in vitro* realizados, se ha demostrado la capacidad de activación del canal TRPV1 en todos los casos, siendo mayor cuando el agente estaba encapsulado en la fibra solo o en combinación con los demás. Esto quiere decir en principio que la fibra estabiliza el producto y hace que produzca un mayor efecto que cuando no está encapsulado. Asimismo, se ha visualizado que si la disolución era más reciente daba mayor señal de fluorescencia. Los datos mostrados no han sido referenciados a la fibra por sí sola, debido a que está se cree que contiene etanol no eliminado del proceso de electrohilado y dicho etanol activa el canal TRPV1 [73] siendo en muchos casos la fluorescencia de la fibra muy superior a la del propio agente a probar. Adicionalmente, no se tienen datos de la concentración residual de etanol en las fibras.

También en varias preparaciones de microscopia óptica se han observado fibras que probablemente contenían etanol debido a su aspecto brillante (Figura 10D). No obstante, el cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas no detectan pico de etanol en la realización de las muestras de fibras. Futuros estudios confirmarán si las nanofibras de PMVEMA-ES presentan etanol y si este es necesario para mantener su estructura estable.

Los ensayos preliminares para testar la actividad de los apósitos experimentales sugieren que el canal se activa al igual que lo hace en los ensayos *in vitro*. El efecto observado consiste en picor, sensación de frescor y rubor en la zona de ensayo. Evidentemente al no probarse en humanos afectados por psoriasis, no se puede comprobar su efectividad. Este último ensayo nos da a pensar que dicho apósitos de nanofibras poliméricas tendrían la función pronosticada en pacientes con psoriasis con una duración de 8 horas. Esto además va en relación con que el apósito alcanzaría un 100% de liberación a las 8 horas aproximadamente. No se sabe si los tratamientos repetidos con la utilización del apósito proporcionarían la misma eficacia y si pueden tener un efecto distinto. Además, para evitar los efectos secundarios de la capsaicina, en esta universidad colaborando con una universidad italiana [82] se han descubierto nuevos compuestos derivados de la capsaicina que podrían aliviar pruritos y psoriasis.

Las propiedades biocompatibles de estos polímeros [83] son también confirmadas en este trabajo cuando están nanoestructurados como nanofibras, ya que no se observaron efectos significativos en la

viabilidad de las líneas celulares. Este dato, junto al resto de resultados obtenidos, indican que las nanofibras electrohiladas de derivados de PMVEA son vehículos prometedores para la administración terapéutica tópica.

6. Conclusiones y proyección futura

Las principales conclusiones de este estudio pueden resumirse como sigue:

- El copolímero de PMVEA-ES puede utilizarse como vehículo de agentes terapéuticos en forma de nanofibras (800-900 nm).
- Los agentes propuestos inicialmente (capsaicina, salicilato de metilo y ácido salicílico) fueron encapsulados con éxito en este trabajo, tanto por separado como juntos.
- Los agentes terapéuticos utilizados son estables en las nanofibras desarrolladas durante al menos 15 días (periodo máximo evaluado), excepto el salicilato de metilo (pérdida de aproximadamente el 50%).
- La activación de los canales TRPV1 por los compuestos salicilato de metilo y capsaicina encapsulados indica que el proceso de electrohilado no altera su actividad y por tanto son susceptibles de su uso para aplicaciones usando esta tecnología.

Futuros estudios demostrarán la eficacia de este parche en personas con psoriasis. Asimismo, se confirmará si el ácido salicílico activa el canal TRPV1 y si las fibras necesitan etanol para mantener su estructura.

7. Bibliografía

1. Zhu, N. and X. Chen, *Biofabrication of tissue scaffolds*, in *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. 2013, InTech.
2. Johnson-Huang, L.M., M.A. Lowes, and J.G. Krueger, *Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies*. *Disease models & mechanisms*, 2012. **5**(4): p. 423-433.
3. Boehncke, W.H. and M.P. Schon, *Psoriasis*. *Lancet*, 2015. **386**(9997): p. 983-94.
4. Harrison TR, K.D., *Harrison Principios de medicina interna*. 19 ed., México, D.F.: McGraw-Hill/Interamericana.
5. Conejo-Mir Sánchez J, M.G.J., Camacho Martínez F, *Manual de dermatología*. Madrid: Aula Médica.
6. Ferrandiz, C., *et al.*, *Prevalence of psoriasis in Spain (Epiderma Project: phase I)*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2001. **15**(1): p. 20-3.
7. Gudjonsson, J.E. and J.T. Elder, *Psoriasis: epidemiology*. *Clin Dermatol*, 2007. **25**(6): p. 535-46.
8. Coates, L.C., *et al.*, *Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same?* *Semin Arthritis Rheum*, 2016. **46**(3): p. 291-304.
9. Fitzpatrick TB, G.L., *Fitzpatrick Dermatología en medicina general*. 2014, México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.
10. Guðjónsson, J.E., *et al.*, *HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with psoriasis vulgaris have distinct clinical features*. *Journal of investigative dermatology*, 2002. **118**(2): p. 362-365.
11. Brufau, R.M., *et al.*, *Estilos de personalidad en pacientes con psoriasis*. *anales de psicología*, 2010. **26**(2): p. 335-340.
12. Elder, J.T., *et al.*, *Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2010. **130**(5): p. 1213-1226.
13. Torrelo, A., *Dermatología en pediatría general*. Aula Médica, 2008. **4**: p. 71-74.

14. de la Cueva Dobao, P. and A.G. Tapia, *Sexualidad y psoriasis.¿ Amistades peligrosas? Más dermatología*, 2010(12): p. 4-13.
15. Puig-Sanz, L., *La psoriasis,¿ una enfermedad sistémica?* Actas dermo-sifiliograficas, 2007. **98**(6): p. 396-402.
16. MacDonald, A. and A.D. Burden, *Psoriasis: advances in pathophysiology and management*. Postgrad Med J, 2007. **83**(985): p. 690-7.
17. Fluhr, J.W., C. Cavallotti, and E. Berardesca, *Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis*. Clinics in dermatology, 2008. **26**(4): p. 380-386.
18. Dawn, A. and G. Yosipovitch, *Treating itch in psoriasis*. Dermatology nursing, 2006. **18**(3): p. 227.
19. Lebwohl, M., *The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis*. International journal of dermatology, 1999. **38**(1): p. 16-24.
20. Wu, K.K.-Y., *Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Biochemical pharmacology, 1998. **55**(5): p. 543-547.
21. Ohta, T., T. Imagawa, and S. Ito, *Involvement of transient receptor potential vanilloid subtype 1 in analgesic action of methylsalicylate*. Molecular pharmacology, 2009. **75**(2): p. 307-317.
22. Anand, P. and K. Bley, *Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch*. British journal of anaesthesia, 2011. **107**(4): p. 490-502.
23. Reyes-Escogido, M.d.L., E.G. Gonzalez-Mondragon, and E. Vazquez-Tzompantzi, *Chemical and pharmacological aspects of capsaicin*. Molecules, 2011. **16**(2): p. 1253-1270.
24. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature, 1997. **389**(6653): p. 816.
25. Ferrer-Montiel, A., et al., *Molecular architecture of the vanilloid receptor*. The FEBS Journal, 2004. **271**(10): p. 1820-1826.
26. Baumann, T.K. and M.E. Martenson, *Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels*. Journal of Neuroscience, 2000. **20**(11): p. RC80-RC80.
27. O'Neill, J., et al., *Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain*. Pharmacological reviews, 2012. **64**(4): p. 939-971.
28. Bode, A.M. and Z. Dong, *The two faces of capsaicin*. Cancer research, 2011. **71**(8): p. 2809-2814.
29. Harada, N. and K. Okajima, *Effect of topical application of capsaicin and its related compounds on dermal insulin-like growth factor-I levels in mice and on facial skin elasticity in humans*. Growth hormone & IGF research, 2007. **17**(2): p. 171-176.
30. Xie, J., X. Li, and Y. Xia, *Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research*. Macromolecular rapid communications, 2008. **29**(22): p. 1775-1792.
31. Schieker, M., et al., *Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering*. European journal of trauma, 2006. **32**(2): p. 114-124.
32. Hutmacher, D.W., M. Sittinger, and M.V. Risbud, *Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems*. TRENDS in Biotechnology, 2004. **22**(7): p. 354-362.
33. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, in *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*. 2006, Elsevier. p. 175-189.
34. Jain, R., et al., *Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches*. Drug development and industrial pharmacy, 1998. **24**(8): p. 703-727.
35. Vo-Dinh, T. and B. Cullum, *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 2000. **366**(6-7): p. 540-551.
36. O'Brien, W.J., *Dental materials and their selection*. 2002.
37. Williams, R., *Surface modification of biomaterials: Methods analysis and applications*. 2010: Elsevier.
38. Ryou, M. and C.C. Thompson, *Tissue adhesives: a review*. Techniques in Gastrointestinal Endoscopy, 2006. **8**(1): p. 33-37.
39. Laurencin, C.T., et al., *Tissue engineering: orthopedic applications*. Annual review of biomedical engineering, 1999. **1**(1): p. 19-46.
40. Eap, S., et al., *A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 1061.
41. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom*. Miniaturization, 1959: p. 282-296.

42. Serena, P.A. and A. Correia, *Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica*. Apuntes de Ciencia y Tecnología, 2003. **9**: p. 32-42.
43. Emilian Leucuta, S., *Nanotechnology for delivery of drugs and biomedical applications*. Current clinical pharmacology, 2010. **5**(4): p. 257-280.
44. Mahapatro, A. and D.K. Singh, *Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines*. Journal of nanobiotechnology, 2011. **9**(1): p. 55.
45. Zhang, R.X., et al., *Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks*. Nanoscale, 2017. **9**(4): p. 1334-1355.
46. Hsu, Y.-H., et al., *Biodegradable drug-eluting nanofiber-enveloped implants for sustained release of high bactericidal concentrations of vancomycin and ceftazidime: in vitro and in vivo studies*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 4347.
47. Agrawal, U., M. Gupta, and S. Vyas, *Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2015. **43**(1): p. 33-39.
48. Baboota, S., et al., *Nanocarrier-based hydrogel of betamethasone dipropionate and salicylic acid for treatment of psoriasis*. International journal of pharmaceutical investigation, 2011. **1**(3): p. 139.
49. Gunn, J. and M. Zhang, *Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges*. Trends in biotechnology, 2010. **28**(4): p. 189-197.
50. Chou, S.-F., D. Carson, and K.A. Woodrow, *Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers*. Journal of Controlled Release, 2015. **220**: p. 584-591.
51. Iglesias, T., et al., *Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly (anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery*. International journal of pharmaceutics, 2017. **517**(1-2): p. 67-79.
52. Chhabra, H., et al., *Gelatin-PMVE/MA composite scaffold promotes expansion of embryonic stem cells*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **37**: p. 184-194.
53. Gardner, C.M., et al., *Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) polymers for cell encapsulation*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2011. **22**(16): p. 2127-2145.
54. Chhabra, H., et al., *A nano zinc oxide doped electrospun scaffold improves wound healing in a rodent model*. RSC Advances, 2016. **6**(2): p. 1428-1439.
55. Arias Sánchez, Á., *Nanofibras poliméricas con ácido 5-aminolevulínico: preparación, caracterización y estudio de liberación in vitro*. 2015.
56. Mira Carrió, A., *Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas*. 2018.
57. Mira, A., et al., *Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 17205.
58. Carrillo-Arcos, U.A., J. Rojas-Ocampo, and S. Porcel, *Oxidative cyclization of alkenoic acids promoted by AgOAc*. Dalton Transactions, 2016. **45**(2): p. 479-483.
59. Doshi, J. and D.H. Reneker, *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. Journal of electrostatics, 1995. **35**(2-3): p. 151-160.
60. Ji, W., et al., *Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications*. Pharmaceutical research, 2011. **28**(6): p. 1259-1272.
61. Shin, Y., et al., *Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities*. Polymer, 2001. **42**(25): p. 09955-09967.
62. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
63. Marín Márquez, P. and P. Martínez Tapias, *Diseño y estudio de una máquina de electrospinning*. 2009.
64. Rosic, R., et al., *Properties, Engineering and Applications of Polymeric Nanofibers: Current Research and Future Advances*. Chemical and biochemical engineering quarterly, 2012. **26**(4): p. 417-425.
65. Ribeiro, C., et al., *Influence of processing conditions on polymorphism and nanofiber morphology of electroactive poly (vinylidene fluoride) electrospun membranes*. Soft Materials, 2010. **8**(3): p. 274-287.
66. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review*. Tissue engineering, 2006. **12**(5): p. 1197-1211.
67. Smolyaninov, I., *Optical microscopy beyond the diffraction limit*. HFSP J, 2008. **2**(3): p. 129-31.

68. Gonzalez-Penas, E., et al., *Simultaneous GC determination of turpentine, camphor, menthol and methyl salicylate in a topical analgesic formulation (Dologex®)*. *Chromatographia*, 2000. **52**(3-4): p. 245-248.
69. Dray, A., C. Forbes, and G. Burgess, *Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro*. *Neuroscience letters*, 1990. **110**(1-2): p. 52-59.
70. Zhang, J.-H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, *A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays*. *Journal of biomolecular screening*, 1999. **4**(2): p. 67-73.
71. Kim, S., et al., *TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1*. *Journal of Neuroscience*, 2006. **26**(9): p. 2403-2412.
72. Manresa Vera, S., *Búsqueda de nuevos analgésicos mediante modulación del canal iónico TRPV1 implicado en mecanismos de transducción de señales nociceptivas*. 2017.
73. Cortright, D.N. and A. Szallasi, *Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1*. *The FEBS Journal*, 2004. **271**(10): p. 1814-1819.
74. Danon, A., S. Ben-Shimon, and Z. Ben-Zvi, *Effect of exercise and heat exposure on percutaneous absorption of methyl salicylate*. *European journal of clinical pharmacology*, 1986. **31**(1): p. 49-52.
75. Xavier, P., et al., *Designer porous antibacterial membranes derived from thermally induced phase separation of PS/PVME blends decorated with an electrospun nanofiber scaffold*. *RSC Advances*, 2016. **6**(13): p. 10865-10872.
76. Opanasopit, P., et al., *Fabrication and properties of capsicum extract-loaded PVA and CA nanofiber patches*. *Pharmaceutical development and technology*, 2013. **18**(5): p. 1140-1147.
77. Gupta, R., et al., *Capsaicin-loaded vesicular systems designed for enhancing localized delivery for psoriasis therapy*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 2016. **44**(3): p. 825-834.
78. Higashi, Y., T. Kiuchi, and K. Furuta, *Efficacy and safety profile of a topical methyl salicylate and menthol patch in adult patients with mild to moderate muscle strain: a randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, multicenter study*. *Clinical therapeutics*, 2010. **32**(1): p. 34-43.
79. Zheng, Y., et al., *Clinical evidence on the efficacy and safety of an antioxidant optimized 1.5% salicylic acid (SA) cream in the treatment of facial acne: an open, baseline-controlled clinical study*. *Skin Research and Technology*, 2013. **19**(2): p. 125-130.
80. Nezarati, R.M., M.B. Eifert, and E. Cosgriff-Hernandez, *Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology*. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2013. **19**(10): p. 810-819.
81. Sánchez, L.M.D., L. Rodríguez, and M. López, *Electrospinning: la era de las nanofibras*. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 2013. **14**(1): p. 10-27.
82. Serafini, M., et al., *Targeting Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channel Softly: The Discovery of Passerini Adducts as a Topical Treatment for Inflammatory Skin Disorders*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. **61**(10): p. 4436-4455.
83. Iglesias, T., et al., *In vitro evaluation of the genotoxicity of poly (anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery*. *International journal of pharmaceutics*, 2017. **523**(1): p. 418-426.